

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

HINGRID ARIANE DA SILVA

Atividade da fração hidrometanólica de milho sobre alguns aspectos do
metabolismo e crescimento de amendoim-bravo

Maringá
2013

HINGRID ARIANE DA SILVA

Atividade da fração hidrometanólica de milho sobre alguns aspectos do
metabolismo e crescimento de amendoim-bravo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para o título de Mestre em Agronomia.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador: Osvaldo Ferrarese Filho

Maringá
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

HINGRID ARIANE DA SILVA

Atividade da fração hidrometanólica de milho sobre alguns aspectos do metabolismo e crescimento de amendoim-bravo

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Agronomia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

Prof. Dr. Carlos Moacir Bonato
Universidade Estadual de Maringá

Prof.^a Dr.^a Patricia da Costa Zonetti
Universidade Federal do Paraná, *campus* Palotina

Prof.^a Dr.^a Franciele Mara Lucca Zanardo Böhm
Universidade Estadual do Paraná, *campus* Paranavaí

Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Aprovada em: 19 de fevereiro de 2013.
Local de defesa: Sala de reuniões 2, Bloco J-45, *campus* sede da
Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Avelino e Luiza, aos meus irmãos Rodrigo e Dayani, e a minha avó Olinda Giroto Piva pelo apoio, carinho e confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu porto seguro e me mostrar alternativas quando o caminho parecia interrompido.

Aos meus familiares, especialmente meu pai, pelo grande incentivo e compreensão nos momentos em que estive ausente.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia (PGA), pela oportunidade concedida.

Ao Professor Dr. Osvaldo Ferrarese Filho, pelo voto de confiança, apoio, orientação e motivação durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dr^a Maria de Lourdes Lucio Ferrarese, pela coorientação e por não medir esforços para que todas as análises de interesse para esta pesquisa fossem realizadas.

Ao Professor Dr. Carlos Moacir Bonato, que me concedeu a primeira oportunidade de trabalho na área de pesquisa, além da colaboração neste trabalho.

Aos meus amigos Flávia Carolina Moreira Vilar, Adriana Gremes Ita Manoel, Rita de Cássia Siqueira Soares e Alexandre Gemelli, pela amizade, convivência, apoio e incentivo.

Aos demais membros da equipe Bioplan, especialmente a Aparecida Maria Dantas Ramos e Fabiano Rodrigo, pelo suporte e auxílio; a Graciene Bido, pela contribuição nas análises de microscopia; e a Rogério Marchiosi, pelos conhecimentos passados.

Aos funcionários da secretaria do PGA, em especial a Érika Sato e Reinaldo Bernardes, pela amizade, prontidão e apoio dispensados.

Aos professores do Departamento de Agronomia, pela contribuição para minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo.

BIOGRAFIA

Hingrid Ariane da Silva, filha de Avelino Alves da Silva e Luiza Maria Piva da Silva, nasceu na cidade de Japurá, Estado do Paraná, no dia 19 de abril de 1988.

Em Março de 2006, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Estadual de Maringá – Campus Regional de Umuarama. Em 2007, transferiu-se para o Campus Sede. Em 2008, foi monitora bolsista da disciplina de Fisiologia Vegetal. Durante a graduação, participou como bolsista dos projetos de extensão e iniciação científica, tendo atuado e desenvolvido atividades no NBA (Núcleo de Biotecnologia Aplicada) e no Laboratório de Fisiologia e Homeopatia Vegetal.

Graduou-se em Engenharia Agrônômica em 2010. Em março de 2011, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, na Universidade Estadual de Maringá.

Atividade da fração hidrometanólica de milho sobre o metabolismo e crescimento de amendoim-bravo

RESUMO

O amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.) é uma planta daninha que está presente em toda área de produção de culturas como a soja e tem alto potencial de reduzir a produtividade e lucratividade destas. Devido aos casos de resistência dessa e outras daninhas aos mais diversos mecanismos de ação de herbicidas, alternativas no manejo dessas invasoras têm sido estudadas. Neste sentido, a alelopatia tem se aprofundado em estudos com uso de culturas de cobertura para o controle das mais diversas daninhas. O milho (*Pennisetum glaucum*) é uma cultura de cobertura utilizada na alimentação animal bem como recuperação de terras degradadas que tem causado supressão de crescimento de ervas daninhas, mostrando, assim, grande potencial para esse fim. A fim de avaliar a atividade alelopática de milho, foram obtidos extratos em solventes orgânicos. O extrato hidrometanólico, o particionado mais ativo, foi utilizado em ensaios de crescimento, avaliação de atividade de enzimas da via de fenilpropanoides (fenilalanina amônia liase e peroxidase ligada à parede celular) e no estresse oxidativo (peroxidase solúvel e peroxidação lipídica) de amendoim-bravo, além de estudo da viabilidade celular das raízes e observação destas em microscopia eletrônica de varredura (MEV), absorção de solução nutritiva, nitrato e amônia. O crescimento de amendoim-bravo foi amplamente reduzido bem como a atividade da fenilalanina amônia liase e peroxidase ligada à parede celular ($p < 0,05$). Foram observados intumescimento e redução da zona de alongamento da raiz. Este sintoma pode ser resultado de uma divisão celular acelerada, estimulada por aleloquímicos da fração. Danos às raízes causados pelo extrato foram visíveis em MEV e comprovados pela redução da viabilidade celular ($p < 0,05$) podendo ter ocasionado colapso no sistema de absorção de íons e solução nutritiva. Não foi observado estresse oxidativo nas plantas.

Palavras-chave: Alelopatia. *Pennisetum glaucum*. *Euphorbia heterophylla*.

Hydromethanol fraction activity of pearl millet on the metabolism and growth of wild poinsettia

ABSTRACT

Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) is a weed present in every area of crops as soybean, and it has a high potential to reduce productivity and profitability of this plant species. Due resistance records of this and other weeds to the diverse mechanisms of herbicides action, alternatives management of weeds has been studied. Therefore, allelopathy has deepened in studies with use of cover crops to control the most diverse weed. Pearl millet (*Pennisetum glaucum*) is a cover crop used in animal feed as well as reclamation land degraded which have caused suppression of weed growth, thus showing great potential for this purpose. For evaluate a possible activity allelopathic, millet extracts were obtained by organic solvents. Hydromethanolic extract, the fraction more active, was used for growth assays, evaluation of enzymes activity of phenylpropanoid pathway (phenylalanine ammonia lyase and cell wall-bound peroxidase) and oxidative stress (soluble peroxidase and lipid peroxidation) of wild poinsettia, roots cell viability and scanning electron microscopy (SEM), absorption of nutrient solution, nitrate and ammonia. Wild poinsettia growth was greatly reduced well as activity of phenylalanine ammonia lyase and cell wall-bound peroxidase ($p<0.05$). Swelling and root elongation zone reduction were noted. This symptom can be result of accelerated cell division, stimulated by allelochemicals from hydromethanolic fraction. Damage in the roots caused by extract were visible by SEM and confirmed through reduction in cell viability ($p<0.05$) and may have caused the collapse in absorption of ions and nutrient solution. Oxidative stress has not been observed in the plants.

Keywords: Allelopathy. *Pennisetum glaucum*. *Euphorbia heterophylla*.

SUMÁRIO

BIOGRAFIA	v
Atividade da fração hidrometanólica de milho sobre o metabolismo e crescimento de amendoim-bravo	vi
RESUMO	vi
Hydromethanol fraction activity of pearl millet on the metabolism and growth of wild poinsettia	vii
ABSTRACT	vii
SUMÁRIO	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Alelopatia.....	3
2.1.1 Histórico e definição	3
2.1.2 Aleloquímicos e seus mecanismos de ação.....	5
2.1.3 Isolamento e caracterização de aleloquímicos	9
2.1.4 Aleloquímicos naturais como herbicidas	11
2.2 Alelopatia e a agricultura.....	13
2.2.1 Culturas de cobertura e manejo de plantas daninhas.....	13
2.2.2 Alelopatia em gramíneas e uso de milho como cobertura	15
2.3 <i>Euphorbia heterophylla</i>	19
2.3.1 Biologia e interferência no cultivo da soja.....	19
2.3.2 Alelopatia no manejo de <i>Euphorbia heterophylla</i>	21
3. OBJETIVOS.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Obtenção de material biológico e cultivo	25
4.2 Cultivo e obtenção da palhada de milho.....	25
4.3 Obtenção do extrato hidrometanólico de milho.....	26
4.4 Delineamento experimental e estatística	26
4.4 Obtenção do extrato genérico para avaliação da atividade de enzimas.....	27
4.5 Atividades das enzimas.....	28
4.5.1 Atividades de enzimas da via dos fenilpropanoides.....	28
4.5.2 Efeito sobre o estresse oxidativo	29

4.6 Dosagem de proteínas.....	30
4.7 Viabilidade celular.....	30
4.8 Variáveis biométricas	30
4.8.1 Comprimento da raiz e parte aérea.....	30
4.8.2 Espessura do caule.....	30
4.8.2 Área foliar.....	31
4.8.3 Massa fresca e seca da raiz e parte aérea	31
4.8.4 Número de folhas por planta	31
4.8.5 Número de nós por planta	31
4.8.6 Mortalidade de plantas	31
4.9 Consumo de solução nutritiva e de nitrogênio	32
4.9.1 Consumo de solução nutritiva	32
4.9.2 Consumo de amônia da solução	32
4.9.3 Consumo de nitrato da solução	32
4.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÕES.....	44
7. REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

O estudo da alelopatia tem recebido considerável atenção, pois os aleloquímicos podem reduzir a produção agrícola, constituir defensivos agrícolas naturais e permitir a utilização de restos culturais como uma ferramenta no manejo integrado de plantas daninhas (FERREIRA & AQUILA, 2000; MORAES et al., 2009).

Geralmente, os aleloquímicos provêm das vias metabólicas do ácido chiquímico e do acetato e podem ser divididos em três grupos: compostos fenólicos, terpenos e compostos nitrogenados (TAIZ & ZEIGER, 2013). Estes podem agir alterando a atividade de enzimas, afetando a divisão celular, germinação, viabilidade celular e crescimento, bem como no acúmulo de massa das plantas alvo, além de interferir na fotossíntese e ainda diminuir a absorção de água e nutrientes pelas plantas (SZCZEPANSKI, 1977; EINHELLIG, 2004; dos SANTOS et al., 2008a, b; POPA et al., 2008; ZANARDO et al., 2008).

O milheto (*Pennisetum glaucum* (L.)) é uma gramínea amplamente empregada na recuperação de solos degradados e alimentação animal e que, entretanto, apresenta poucos estudos sobre possíveis efeitos alelopáticos. Por sua vez, o incremento constante no número de daninhas resistentes aos herbicidas sintéticos gera a necessidade de adoção de novas estratégias de manejo de plantas daninhas bem como a busca por novas substâncias que atuem como herbicidas (BHOWMIK, 2000; DUKE et al., 2002). O amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* (L.)), por exemplo, é uma planta daninha que infesta a maioria dos campos de soja do Brasil e tem alto potencial de reduzir a sua (MASCHEDE et al., 2002), pois, quando esta cultura é submetida a competição com esta planta daninha, a altura de plantas é afetada e ocorre redução no número de trifólios e no acúmulo de matéria seca, que refletem em menor produtividade (CARVALHO et al., 2010). Tendo em vista os diversos casos de resistência aos mecanismos de ação que esta planta apresenta (TREZZI et al., 2005; HEAP, 2011), o controle químico desta daninha tem se dado muitas vezes de forma insatisfatória. Como os aleloquímicos podem agir pelos mais variados e novos mecanismos de ação, o uso

da alelopatia no manejo ou o controle de plantas daninhas é uma alternativa que pode se somar as opções de controle existentes.

TREZZI e VIDAL (2004) verificaram que a utilização de 4,0 ton ha⁻¹ de palhada de milho suprimiu em 91% a população de *Brachiaria plantaginea*. Em 2006, estudos conduzidos por TREZZI e colaboradores constataram que a palhada de sorgo, milho ou aveia, na superfície do solo, reduziram a velocidade de emergência e o número de folhas de *E. heterophylla*. Eles atribuíram este resultado tanto ao efeito físico da palhada como à alelopatia. No entanto, poucos estudos isolaram o efeito alelopático da barreira física imposta pela palhada à germinação e crescimento de daninhas.

Neste sentido, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da fração hidrometanólica obtida a partir do fracionamento da palhada seca de milho cv. ADR-300, no metabolismo e crescimento de amendoim-bravo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Alelopatia

2.1.1 Histórico e definição

O primeiro relato de interferência de uma planta sobre o desenvolvimento de outra se deu por volta de 300 a.C.. Theophrastus e, mais tarde, Pliny descreveram efeitos deletérios entre uma planta e outra como um fenômeno importante na agricultura. Em 1832, Dencandolle sugeriu que plantas poderiam liberar substâncias pelas raízes, as quais seriam prejudiciais às culturas subsequentes. Em 1881, Hoy e Stickney reforçaram a existência desse fenômeno ao observar a supressão de crescimento da comunidade vegetal ao redor de noqueira-preta (*Juglans nigra*). Uma substância proveniente da parte aérea desta arbórea em contato com o solo sofria hidrólise e oxidação formando uma naftoquinona fitotóxica, chamada juglona. Enfim, em 1937, Molisch criou a expressão alelopatia (do grego *allelon* = de um para outro, *pathós* = sofrer) (FRIEDMAN & WALLER, 1984). Em 1984, Rice utilizou o mesmo termo para designar interações bioquímicas prejudiciais ou benéficas que acontecem tanto planta-planta como entre planta e micro-organismos. Nos dias de hoje, a definição para o termo alelopatia adotada pela Sociedade Internacional de Alelopatia descreve “qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciem o crescimento das culturas ou sistemas biológicos” (PINTO et al., 2002).

A alelopatia representa uma contribuição química às adaptações de defesa das plantas ao ambiente (INDERJIT et al., 2011). Essas interações aleloquímicas entre plantas são reconhecidas como fatores-chave no padrão de crescimento da vegetação, no crescimento das plantas invasoras e na produção das culturas nos sistemas agrícolas (RICE, 1984). Compostos secundários com potencial aleloquímico tem grande diversidade química, estão envolvidos em muitos processos metabólicos e ecológicos (RICE, 1984; EINHELLIG, 1995) e podem

exercer efeitos devidos às suas estruturas químicas originais ou serem precursores de diferentes compostos tóxicos resultantes da decomposição da matéria orgânica.

A produção de aleloquímicos é fortemente influenciada por fatores externos e, portanto, a composição e concentração produzida são variáveis em função do estresse biótico e abiótico ao qual a planta é submetida. Estresses abióticos, como toxicidade por metais pesados, sombreamento, altas temperaturas e alta concentração de sais no solo, aumentam a produção de aleloquímicos (EINHELLIG, 1999; WU et al., 1999; BELZ, 2007). No entanto, pouco se sabe sobre os processos envolvidos na sinalização para a produção de aleloquímicos. KATO-NOGUCHI (2009) defende que a produção destes metabólitos secundários em arroz é induzida pelos ácidos jasmônico e salicílico, importantes moléculas de sinalização que regulam genes de defesa da planta.

Para entender melhor o fenômeno da alelopatia, é preciso diferenciá-lo da simples competição entre plantas. Ambas são formas de interferência, mas na alelopatia a planta com potencial alelopático libera um princípio tóxico no meio, enquanto que na competição entre plantas um ou mais fatores necessários para o crescimento destas (água, nutrientes e outros) são retirados do ambiente (FRIEDMAN & WALLER, 1985). Outro evento comum observado na ciência da alelopatia é que um composto alelopático pode também ser tóxico para o próprio indivíduo doador (SZCZEPANSKI, 1977). A esse efeito autoinibitório dá-se o nome de autotoxicidade ou ainda autoalelopatia. Na agricultura, são importantes os relatos de ocorrência de autoalelopatia em áreas de cultivo de cenoura, cana-de-açúcar, trigo e pepino (YOUNG et al., 1989; JASICKA-MISIAK et al., 2005; SAMPIETRO, 2006; YE et al., 2006).

Os aleloquímicos podem ser secretados pelas raízes ou lixiviados dos tecidos de plantas, volatilizados ou liberados após a decomposição destas (SZCZEPANSKI, 1977; FRIEDMAN & WALLER, 1985). No entanto, a exsudação pelas raízes parece ser a forma mais comum pela qual estas substâncias ativas são liberadas para o meio (RICE, 1984). Alguns químicos liberados pelas raízes das espécies de plantas podem até mesmo tornar nutrientes complexados disponíveis (INDERJIT et al., 2011). Estes produtos químicos podem ainda ter

outros papéis ecológicos importantes como a defesa da planta, quelar metais, regulação da biota do solo e sua fertilidade. Vale lembrar que nem todos os compostos orgânicos liberados no ambiente externo têm caráter alelopático.

O estudo da alelopatia tem recebido considerável atenção nos últimos anos, seja pelos aleloquímicos liberados ao meio, que podem diminuir a produção agrícola, seja pelo potencial que representam como defensivos agrícolas naturais. Outra possibilidade de interesse é a integração dos fenômenos alelopáticos dentro dos sistemas de produção agrícola que permita a utilização de restos culturais como uma ferramenta no manejo integrado de plantas daninhas (FERREIRA & AQUILA, 2000; MORAES et al., 2009).

Apesar dos relatos de alelopatia antecederem a era cristã, a natureza de aleloquímicos, as formas pelas quais estes são liberados no meio pela planta doadora, o seu destino no solo e sua absorção, translocação e modo de ação dentro da planta receptora são processos que ainda precisam ser melhor entendidos (FRIEDMAN & WALLER, 1985).

2.1.2 Aleloquímicos e seus mecanismos de ação

Os aleloquímicos são primordialmente oriundos do metabolismo secundário. Com raras exceções, eles provêm em geral das vias metabólicas do ácido chiquímico ou do acetato ou, ainda, de esqueletos químicos resultantes da combinação dessas duas vias.

Existem muitos compostos envolvidos na alelopatia como os ácidos graxos de cadeia longa e poliacetilenos, ácidos orgânicos solúveis em água, aldeídos alifáticos e cetonas, alcaloides e cianidrinas, alcoóis de cadeia curta, aminoácidos como o aminoácido não-proteico L-3,4-dihidroxifenilalanina (*L*-DOPA), derivados de aminoácidos e polipeptídeos, derivados sulfurados e glicosídeos, chalconas e flavonoides, taninos, terpenoides, lactonas simples insaturadas e esteroides, naftoquinonas, antraquinonas e quinonas complexas, dentre estas quinonas é importante citar sorgoleona e juglona, ácidos carboxílicos, ácidos fenólicos como ácido benzoico, ácidos hidrobenzoicos como o BOA (benzoxazolinona) e seu derivado DIBOA (2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona) e

hidroxicinâmicos como o cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, sinápico e seus derivados, lignina e seus derivados, purinas e nucleosídeos (SZCZEPANSKI, 1977; RICE 1984; YENISH et al., 1995; EINHELLIG, 1986; INDERJIT, 1996; INDEJIT & DUKE 2003; YE, 2006; HACHINOHE & MATSUMOTO, 2007; MAIRESSE et al., 2007; POPA, 2008; MATSUMOTO et al., 2010).

São conhecidos pelo menos quarenta e cinco mil compostos secundários. Após diversas tentativas de agrupamento destes compostos, TAIZ & ZEIGER (2013) adotaram uma divisão destes em três grupos que foram formados levando em conta a via de biossíntese destes compostos que vem sendo utilizada até os dias de hoje. São eles: compostos fenólicos, terpenos e compostos nitrogenados. Os compostos fenólicos e os terpenos representam os principais compostos com características alelopáticas. Os primeiros constituem um grupo formado por ácidos fenólicos, flavonoides e cumarinas. Os terpenos, por sua vez, constituem um grupo formado pelo monoterpenos, di e triterpenos, sesquiterpenos e politerpenos.

Nos últimos anos, os ácidos fenólicos simples, em especial os derivados dos ácidos cinâmico e benzoico como os ácidos clorogênico, *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, protocatecuico, *p*-hidroxibenzoico, gálico e salicílico, têm ganhado importância. Entre suas conhecidas atividades, estão as ações antioxidantes, antifúngicas, associadas aos mecanismos de defesa, alelopatia e resistência. Esta grande amplitude deste fenômeno ocorre porque a hidrólise ácida dos tecidos de plantas vasculares libera derivados fenólicos. Entre as angiospermas, por exemplo, são comumente encontrados os ácidos vanílico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico e siríngico (LAPIERRE, 1993).

Assim, estudos com compostos fenólicos parecem ser os mais difundidos. Dos SANTOS et al. (2004; 2008,b) avaliaram os efeitos do ácido ferúlico em raízes de soja e observaram redução do crescimento da raiz, massa fresca e seca e incremento da atividade das peroxidase ligada e solúvel, da PAL (fenilalanina amônia liase) e do teor de lignina, além da redução da atividade da CAD (cinamil álcool desidrogenase). O estímulo das enzimas envolvidas na via dos fenilpropanoides leva a maior produção de lignina que formam uma parede celular mais rígida impedindo o crescimento das raízes. Ainda são citados o efeito de

ácido ferúlico na utilização de água, expansão foliar, fotossíntese, respiração celular e integridade de membrana, e na absorção de nutrientes, entre outros. A hipótese de que o ácido ferúlico exógeno pode ser esterificado com polissacarídeos da parede celular, incorporando-se na estrutura da lignina ou formar pontes que ligam a lignina com polissacarídeos, enrijecendo a parede das células e, assim, restringindo o crescimento celular, tem sido defendida por dos SANTOS et al. (2008a).

Estudando o ácido *p*-cumárico ZANARDO et al. (2008) também constataram redução no comprimento da raiz, massa fresca e seca de raízes de soja com incremento das doses deste aleloquímico, bem como redução da viabilidade celular, atividade da PAL e da produção de peróxido de hidrogênio, além de maiores teores de lignina. BUBNA et al. (2011) encontraram resultados parecidos com a aplicação do ácido cafeico. Da mesma forma, o crescimento, massa fresca e seca das raízes, atividade da PAL, peroxidases solúvel e ligada de soja foram suprimidas. Segundo estes dois últimos autores, os ácidos *p*-cumárico e cafeico, aplicados exogenamente, podem ser canalizados para via dos fenilpropanoides e serem convertidos, no final dela, em mais lignina, dando origem a uma parede celular mais rígida, o que impede o crescimento.

Alguns compostos fenólicos parecem atuar como inibidores endógenos da germinação, já que o acúmulo dessas substâncias provocaria a perda da viabilidade da semente. É o que pressupôs SATHIYAMOORTHY (1990) ao identificar o ácido *p*-cumárico em lixiviados de sementes de soja não viáveis, mas não em sementes consideradas viáveis. O custo da biossíntese não é conhecido, mas há indicações de que cerca de 2% do carbono fotossintético é desviado para a biossíntese de ácidos fenólicos (STRACK, 1997).

Quando se trata de efeito alelopático em sementes, quase sempre a redução na porcentagem de sementes germinadas é observada (WINK & TWARDOWSKI, 1992; EINHELLIG, 2004). Ácidos araquídico, behênico, palmítico e esteárico bem como os ácidos cafeico e ferúlico, reduziram a emergência de plântulas de diversas espécies daninhas, sendo que os derivados

hidrocinâmicos se mostraram mais ativos em doses dez vezes menores que os demais (XUAN & TSUZUKI, 2004).

SZCZEPANSKI (1977) descreveu a interferência de aleloquímicos na fotossíntese uma vez que o transporte de carboidratos é severamente afetado por certos aleloquímicos (RIZVI et al., 1992). A respiração e diversas enzimas do metabolismo também são constantemente afetadas, bem como alteração da permeabilidade da membrana e a absorção de íons (EINHELLIG, 1986; EINHELLIG, 2004). Entre os eventos que comumente são afetados por sesquiterpenos, lactonas, ácidos fenólicos e orgânicos incluem a redução no teor de clorofila, redução na absorção de água e nutrientes, e ainda a inibição de estabelecimento da simbiose em leguminosas, o que leva à formação de nódulos responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio (POPA et al., 2008).

Sorgoleona, uma quinona encontrada nos exsudados de sorgo, é um inibidor do mesmo sítio de atuação do herbicida atrazina. Assim como este herbicida, sorgoleona é inibidor do transporte de elétrons do fotossistema II (GONZALEZ et al., 1997) e é considerado um potente herbicida por bloquear a transferência de elétron de QA para QB da proteína D1, uma vez que tem afinidade no sítio de ligação da QB, bloqueando a passagem de elétron (CZARNOTA et al., 2001). GATTÁS-HALAK et al. (1999) comprovaram que sorgoleona também influencia a divisão celular, inibindo a mitose e ainda reduz severamente o crescimento tanto de dicotiledôneas como de monocotiledôneas (CZARNOTA et al., 2001).

Juglona, outra quinona, reduziu o comprimento da raiz e a massa fresca e seca de soja, seguida por perda importante na viabilidade celular. Peroxidades, solúvel e ligada à parede celular, tiveram a atividade diminuída, e a atividade da PAL bem como o conteúdo de lignina foram incrementados por este aleloquímico (BÖHM et al., 2010).

GLASS (1973) e YU e MATSUI, (1997) observaram o grande potencial dos ácidos fenólicos em inibir a absorção de íons devido à despolarização das membranas ocasionadas por estes ácidos. YU & MATSUI (1997), em estudos com ácido cinâmico em pepino, observaram aumento de extravasamento de íons e da

permeabilidade de membranas bem como incremento da atividade de enzimas antioxidantes como peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) que ocasionaram a redução de fotossíntese (YU et al., 2003).

Redução da área foliar e incremento da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo, como a SOD, GPX (glutathione peroxidase) e APX (ascorbato peroxidase), em pepino submetidos ao crescimento com ácido cinâmico, bem como aumento de espécies reativas de oxigênio como H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ e da peroxidação lipídica, também foi observado por YE et al. (2006). Os mesmos autores ainda verificaram significativo decréscimo nas atividades das enzimas ATPase (adenosina trifosfato sintetase) e PPase (pirofosfatase) com incrementos das doses de cinâmico. O ácido cinâmico ainda causou grande incremento da atividade de enzimas envolvidas na via de formação de lignina como a PAL e PPO (polifenolase) nas raízes destas plantas. Quase sempre, o aumento da atividade das enzimas desta via refletem em aumento no conteúdo de lignina.

O metabolismo oxidativo de plantas também pode ser alvo de aleloquímicos. BAIS et al. (2003) relataram que o polifenol catequina pode aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). A superprodução de ROS leva ao estresse oxidativo causando danos através de ações como a peroxidação lipídica, destruição de membranas, inativação de proteínas e até mesmo a mutação do DNA.

Flavonoides, como as flavonas, catequinas, antocianinas, proantocianinas e isoflavonoides, também podem agir como aleloquímicos. MATSUMOTO et al. (2010) observaram efeito inibitório do extrato de *Annona glabra* L. no crescimento inicial de várias espécies. Estes autores ligaram esse efeito à presença do flavonoide quercetina.

2.1.3 Isolamento e caracterização de aleloquímicos

Grande parte dos estudos no campo da alelopatia está voltada para o isolamento e identificação de estruturas dos compostos que causam efeito alelopático. Há abundantes informações sobre as estruturas químicas e aspectos pertinentes de sua interação com o ambiente. MACIAS et al. (2007) citam que

entre as técnicas analíticas mais promissoras, normalmente empregadas nas análises de extratos vegetais, encontram-se as cromatográficas aliadas a análise de RMN (ressonância magnética nuclear) e análise de raios X. Outras técnicas importantes no ramo da química de produtos naturais incluem, ainda, análise de combustão e espectrometria de massa.

Geralmente a preparação das amostras para isolamento e caracterização envolve a partição do extrato bruto da planta em diversos solventes de polaridades variáveis como hexano, acetato, butanol, etanol e metanol. Cada fração é então testada separadamente e as ativas sofrem nova partição ou purificação para caracterização por técnicas de RMN, cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese capilar entre outras (SOUZA FILHO et al., 2005; REZENDE et al., 2011).

Para estudar os aleloquímicos disponíveis em *Brachiaria humidicola*, SOUZA FILHO et al. (2005) particionaram sucessivamente a massa seca desta planta em solventes com polaridade crescente, partindo do hexano, passando pelo acetato de etila, metanol e metanol + água. Cada uma dessas frações foi filtrada a vácuo, destilada sobre pressão reduzida e rota-evaporada, formando frações brutas. Cada extrato bruto teve seu potencial alelopático testado frente à germinação de *Mimosa pudica*. A fração hidrometanólica, a mais promissora entre as testadas, foi então novamente destilada a vácuo até eliminação total do metanol, e a solução resultante submetida foi mais uma vez fracionada por partição líquido-líquido com *n*-hexano, diclorometano e acetato de etila. As frações foram submetidas à cromatografia líquida, em coluna de sílica, e as frações separadas foram reunidas, após destilação e análise por cromatografia em camada delgada, obtendo-se seis grupos de frações. Foram realizadas sucessivas cromatografias, em coluna e em placa preparativa, até a purificação das substâncias químicas com atividade alelopática. A identificação estrutural foi realizada por RMN e o ácido *p*-cumárico foi definido como substância ativa. Procedimento parecido foi adotado para identificação de catequinas em *Tachigali myrmecophyla* por LOBO et al. (2008) e de estigmasterol glicosilado e sitosterol glicosilado em *Annona crassiflora* (INOUE et al., 2010).

A aplicação de tais técnicas, porém, constitui um procedimento que consome tempo razoável, podendo tornar-se monótono, especialmente quando se envolvem misturas complexas de várias classes de produtos provenientes dos extratos de plantas.

2.1.4 Aleloquímicos naturais como herbicidas

O incremento constante no número de plantas daninhas resistentes aos herbicidas sintéticos existentes, cada vez menos eficazes no controle de biótipos resistentes, gera a necessidade de adoção de novas estratégias de manejo de plantas daninhas, bem como a busca por novas substâncias que atuem como herbicidas (BHOWMIK 2000; DUKE et al., 2002). As notificações importantes de biótipos de daninhas resistentes no Brasil incluem a resistência cruzada de *Euphorbia heterophylla* e *Bidens pilosa* às imidazolinonas e sulfuniluréias, e a resistência múltipla de *E. heterophylla* aos herbicidas inibidores da ALS (acetolactato sintase) e da Protox detectada em lavouras da região sudoeste do Paraná (TREZZI et al., 2005). Outros casos importante estão ligados ao grupo dos inibidores da EPSPsintase, no qual o principal representante é o glyphosate, o herbicida mais largamente empregado na agricultura atualmente. Diversas espécies de daninhas já foram descritas como tolerantes ou resistentes ao mecanismo de ação do glifosato, sendo importante citar a descoberta de populações resistentes de *Conyza canadensis* e *C. bonariensis*, bem como *E. heterophylla* e *Amaranthus* sp. (CERDEIRA et al., 2007; LAMEGO & VIDAL, 2008).

Para DUKE et al. (2000), compostos naturais têm várias vantagens sobre os compostos sintéticos quando apresentam bioatividade. Um dos motivos é que compostos naturais podem apresentar mecanismo de ação novo devido à maior diversidade de estrutura molecular (BHOWMIK, 2003) agindo de forma incomum a dos mecanismos de ação de herbicidas utilizados hoje, sendo, portanto, menos possível encontrar populações resistentes.

Substâncias alelopáticas isoladas de plantas que mais tarde foram sintetizadas por empresas para serem utilizadas como agroquímicos incluem o Cineol (SHELL), benzoxazinonas (BASF), o ácido quinolínico (BASF) e

leptospermones (ZENECA). Estas têm sido utilizados na agricultura com resultados promissores (KOHLI et al., 1998). Alguns dos produtos naturais explorados como herbicidas comerciais ainda incluem triquetona, cimetilina, bialafos, glufosinato, cloraben e o dicamba. O dicamba e clorabem, por exemplo, são derivados de ácido benzoico encontrado em plantas. Alguns outros compostos naturais apresentam grande atividade herbicida, mas ainda não são utilizados comercialmente, entre eles estão artemisinina, sorgoleona e ailanthona (BHOWMIK, 2003).

No entanto, também existem algumas limitações para a utilização de aleloquímicos como herbicidas. Muitas das substâncias ativas apresentam custo elevado para síntese e a maioria tem atividade limitada e meia-vida curta no ambiente (DUKE et al., 2000). Além do que, os herbicidas naturais, assim como o sintéticos, também podem ser tóxicos para os organismos não-alvo como inimigos naturais e vegetação adjacente a áreas de cultivo (BHOWMIK, 2003). MACÍAS (1995) defende que bons candidatos a herbicidas naturais, do ponto de vista ambiental, devem ser ativos em concentrações entre 10^{-5} e 10^{-7} M. Muitos compostos fenólicos, alcaloides e quinonas têm uma faixa de atividade de 10^{-2} a 10^{-5} M. Outro desafio é que a supressão de materiais vegetais em espécies de plantas daninhas é seletiva. Uma espécie de planta pode apresentar fortes propriedades alelopáticas sobre uma planta daninha, mas não interferir nas demais que fazem parte da comunidade infestante. Assim, o impacto das plantas alelopáticas sobre plantas daninhas é diferente de espécie para espécie (XUAN, 2005).

A maior parte dos ácidos fenólicos simples e flavonoides são conhecidos por serem bioativos. No entanto, no solo, parecem se apresentar como fitotoxinas fracas. Outros compostos, como os ácidos salicílico e *p*-hidroxibenzoico, por exemplo, em doses elevadas, são eficazes contra as ervas daninhas e são relativamente não seletivos a maioria das espécies (DUKE & LYDON, 1987). Alterações sintéticas estruturais destes compostos, no entanto, podem aumentar a sua atividade e seletividade contra as espécies de plantas daninhas e cultivadas, respectivamente.

2.2 Alelopatia e a agricultura

2.2.1 Culturas de cobertura e manejo de plantas daninhas

RICE (1995) avaliou os aspectos da aplicação da alelopatia no manejo de plantas daninhas. Resíduos vegetais provenientes de culturas podem fornecer controle de plantas daninhas através da resistência física que impõem, bem como agir de forma a barrar a captação de luz pelas espécies daninhas, impedindo a emergência destas plantas, ou ainda limitar ou suprimir a germinação e crescimento pela liberação de aleloquímicos (INDERJIT & KEATING, 1999). Culturas, como centeio (*Secale cereale* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), trigo mourisco (*Fagopyrum esculentum* Moench.), mostarda preta (*Brassica nigra* L. Koch), híbridos de sorgo (*Sorghum* sp.), mucuna (*Mucuna pruriens*), girassol (*Helianthus annuus*), bem como as várias espécies de brachiaria, atuam desta forma quando utilizadas nos sistemas de rotação e tem, portanto, potencial de uso no manejo de plantas daninhas (WESTON, 1996; SOUZA FILHO et al., 1997).

A alelopatia pode desempenhar um papel benéfico em vários sistemas de cultivos como a policultura, uso de culturas de coberturas, rotação de culturas, cultivo mínimo e plantio direto. O cultivo de girassol (*Helianthus annuus* L.), em rotação com aveia durante cinco safras, causou menor incremento na densidade de plantas daninhas nas parcelas onde o sistema de rotação foi adotado (LEATHER, 1987). Lactonas sesquiterpênicas com germacranolide e esqueletos guaianolide e heliannuol liberados pela decomposição do girassol seriam responsáveis pela atividade alelopática (MACIAS et al., 2000).

Métodos de manejo alternativos têm merecido atenção no controle de plantas invasoras e a alelopatia oferece potencial para ser usado no controle racional dessas plantas. A esperança é que os aleloquímicos, algumas vezes referidos como herbicidas naturais, possam ajudar na preservação do potencial reprodutivo aliado à redução da degradação do meio ambiente. BARNES & PUTNAM (1983) relataram que o resíduo de centeio, utilizado como cobertura morta, reduziu a biomassa total de plantas daninhas em 63%. Apesar de CARDINA (1995) defender que parte de supressão de plantas daninhas seja

devido ao impedimento físico de germinação das sementes ou de sombreamento proporcionando pela cobertura, o desaparecimento de aleloquímicos centeio foi intimamente relacionado com a redução do nível de supressão de plantas daninhas.

FUJII et al. (1992) relataram que a mucuna (*Mucuna pruriens* (L.) DC. var. utilis) é boa candidata para controle de plantas daninhas de fácil manejo. Eles identificaram o L-DOPA (L-3,4-di-hidroxifenilalanina) como o composto químico responsável pela fitotoxicidade desta planta. A alfafa (*Medicago sativa* L. alfafa cv Rasen.), utilizada para produção de feno na pecuária, reduziu em 80% a biomassa de plantas daninhas, sob condições de campo (XUAN et al., 2002).

Brachiaria decumbens, *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum*, três das espécies mais utilizadas como gramíneas de pastejo no Brasil, foram avaliadas em sistemas de integração com a cultura do milho no que diz respeito aos efeitos destas plantas sobre a infestação de plantas daninhas (SEVERINO et al., 2006). Os resultados mostraram que *B. brizantha* foi a forrageira mais eficiente em reduzir a infestação de *Ipomea grandifolia*. *P. maximum* foi a espécie que mais reduziu o crescimento de *Amaranthus hybridus* e a área foliar de *Digitaria horizontalis*.

Para grande parte dos autores, culturas de cobertura não são tão eficazes na contenção de espécies de plantas daninhas se adotadas como única estratégia de manejo, devendo assim ser atrelada ao controle químico. É senso comum, que além da utilização de culturas de cobertura ou resíduos, herbicidas pós-emergência são necessários (SEVERINO & CHRISTOFFOLETI, 2004). O uso de plantas alelopáticas em rotação ou como adubo verde não fornece o mesmo nível de controle de ervas daninhas como os herbicidas sintéticos, mas o montante restante de plantas daninhas que nascem do banco de sementes do solo após o desaparecimento dos aleloquímicos podem ser controlados com sucesso com uma dose menor de herbicidas ou pelo sombreamento da cultura que foi favorecida nos estádios iniciais (XUAN, 2005).

Plantas daninhas perenes em geral não têm crescimento afetado pelo uso de culturas de cobertura. Acredita-se que o crescimento de certas ervas daninhas perenes possa ser favorecido devido a luz vermelha-distante que ocorre abaixo da massa de cobertura morta sobre o solo (ALDRICH, 1984). No entanto, um estudo

com alelopatia e dois biótipos triazina-resistentes e suscetíveis de *Amaranthus retroflexus*, uma daninha perene, mostrou que biótipos resistentes foram mais influenciados por aleloquímicos quando comparado com biótipo sensível. Assim, alguns biótipos resistentes de plantas daninhas poderiam ser controlados com plantas de cobertura ou resíduos alelopáticos (HENSLEY & COUNSELMAN, 1979).

Segundo INDERJIT & KEATING (1999), até 100% de controle das plantas daninhas poderia ser alcançado pelo manejo de culturas de cobertura ou de resíduos de colheita. PUTNAM et al. (1983) sugeriram que o sucesso do controle de plantas daninhas poderia ser alcançado por meio de cultivo de culturas de coberturas como o centeio, cevada, trigo e sorgo até que atinjam uma altura de 40-50 cm, as quais seriam, em seguida, dessecadas por herbicidas, permitindo, assim, que os resíduos destas permanecessem na superfície do solo.

2.2.2 Alelopatia em gramíneas e uso de milho como cobertura

Ácidos hidroxicinâmicos (4-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-onas) estão presentes em espécies cultivadas e não domesticadas da família das poaceas (NIEMEYER et al., 1992). Dos hidroxicinâmicos relatados em cereais, grande parte inclui BOA, DIBOA e DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona) (BHOWMIK, 2003).

A escopoletina, assim como vários ácidos fenólicos e aminoácidos, é citada como possível aleloquímico proveniente de aveia (FAY & DUKE, 1977; SÁNCHEZ-MOREIRAS et al., 2004). Vários ácidos fenólicos (*p*-hidroxibenzoico, *trans-p*-cumárico, ácido *cis-p*-cumárico, siringico, vanílico, ácidos *trans*- e *cis*-ferúlico e 2,4-di-hidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona) foram identificados em trigo (WU et al., 2000). Diversas cultivares de trigo que apresentaram atividade alelopática possuem grandes quantidades destes compostos (WU et al., 1998). ALMEIDA & RODRIGUES (1984) verificaram que o ácido ferúlico, presente em resíduos de trigo em decomposição, em lavouras sobre plantio direto, foi capaz de afetar a germinação e crescimento de culturas como a soja, sendo de grande importância também no controle de espécies de plantas daninhas. O uso destas

substâncias ou cultivo de cultivares de trigo com característica alelopática pode ser utilizado para manejar plantas daninhas naturalmente (BHOWMIK, 2003).

Em relação à aveia, estudos de diferentes pesquisadores sugerem que a exsudação de escopoletina pelas raízes destas plantas poderia ser responsável pelo possível efeito alelopático da cultura. No entanto, além deste composto, cumarina, ácido *p*-hidroxibenzoico e ácido vanílico também estão presentes em exsudatos de espécies do gênero aveia (PEREZ & NUNES, 1991), sugerindo que os efeitos possam ser oriundos de outros compostos ou da interação entre eles. Tal interesse tem despertado a atenção de programas de melhoramento no sentido de identificar genótipos de aveia com maior potencial alelopático (JACOBI & FLECK, 2000).

O efeito alelopático do sorgo é um dos mais bem conhecidos. Um estudo realizado no campo, com sorgo granífero (*Sorghum bicolor*) precedendo milho e soja, mostrou que o efeito supressivo do sorgo na emergência de plantas daninhas foi evidente nas culturas seguintes (EINHELLIG & RASMUSSEN, 1989). GUENZI et al. (1967) relataram que os resíduos de sorgo, aveia e milho foram tóxicos tanto na época da colheita como após a decomposição parcial da palhada. A toxicidade persistiu por quatro semanas em resíduos de trigo e aveia, e por vinte e duas semanas em resíduos de milho e sorgo.

Foram evidenciados efeitos expressivos de *Brachiaria plantaginea* na redução do banco de sementes de *Commelina benghalensis* no solo. Nos extratos da *B. plantaginea*, foram identificados altos teores de ácido aconítico. O composto purificado foi testado em algumas espécies de plantas daninhas, confirmando sua atividade alelopática (VOLL et al., 2004; 2009). Existem informações na literatura citando a presença do ácido aconítico em diversas espécies de gramíneas, que evidencia a importância de se entender o efeito potencialmente alelopático que espécies utilizadas em pastagens podem ter sobre as plantas daninhas.

O milheto é uma gramínea anual, oriunda da África, e introduzida no Brasil nos anos 70. O seu nome científico é *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. e recebe diferentes nomes vulgares, tais como milheto-comum e milheto-pérola. Pode ser plantado em diversas regiões, mas seu cultivo tem sido feito em regiões semiáridas, como o Nordeste brasileiro, e em regiões de Cerrados e no Brasil

Central. O uso do milho como planta forrageira no Brasil tem sido indicado para três finalidades: implantação e recuperação de pastagens, produção de forragem para pastejo ou silagem. Presta-se, também, para plantio tardio ou de safrinha, após a colheita da cultura principal, para regiões nas quais não ocorrem geadas e que têm precipitações até o mês de maio. Nestas condições, o milho pode alcançar produção de massa seca superior ao sorgo, com melhor qualidade de grãos e também proporcionar boa cobertura do solo (PEREIRA FILHO, et al., 2003; AMIN & MELLO, 2009).

Como principais características agrônômicas do milho vale citar a alta resistência à seca, adaptação aos solos ácidos e de baixa fertilidade, rápido crescimento, grande capacidade de produção de massa, alta qualidade de forragem e fácil produção de sementes (CALVO et al., 2010). Além disso, sua multiplicidade de uso dentro de sistemas de rotação, sucessão, tem estimulado o forte crescimento da área plantada, especialmente enquanto alternativa de manejo das áreas degradadas de pecuária (BRUCK et al., 2000).

Entretanto, estudos sobre possíveis efeitos alelopáticos do milho são limitados. Há o relato de TREZZI & VIDAL (2004) que verificaram que a utilização de 4,0 ton ha⁻¹ de palha de milho resultou na supressão de 91% da população de *Brachiaria plantaginea*. Em trabalhos desenvolvidos por FREITAS et al. (2006), concluíram que a utilização da palhada de milho antecedendo o plantio de soja possibilitou a redução das doses dos herbicidas utilizadas para o controle em pós-emergência das plantas daninhas que infestavam a cultura. Em ambos os casos, no entanto, as avaliações se restringiram ao efeito das palhadas sobre a emergência das plantas daninhas presentes nas áreas experimentais, sem isolar os efeitos predominantes (químico, mecânico, biológico) destas.

O trabalho de TREZZI & VIDAL (2004) constatou que o plantio do genótipo de milho Comum RS reduziu a densidade de *Bidens pilosa* bem como da comunidade em geral de plantas daninhas na linha de cultivo. TREZZI et al., (2005) avaliaram a toxicidade dos extratos hidrofóbicos e hidrofílicos provenientes da parte aérea de milho (*Pennisetum americanum*) e sorgo em plantas de alface e constataram que os extratos de milho apresentaram maior toxicidade que os de

sorgo e reduziram a germinação e comprimento da raiz e parte aérea da planta receptora. Trabalho realizado por TOKURA & NOBREGA (2006) testando culturas de coberturas como trigo, aveia preta, colza, nabo forrageiro e milheto (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke/K.Schum) precedendo milho, constatou que o milheto apresentou maior controle sobre as plantas infestantes.

FARIA et al. (2009) analisaram a influência de extratos de milheto (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke/K.Schum), mucuna (*Stizolobium aterrimum* Piper & Tracy) e *Pinus* sp. na germinação, colonização micorrízica e crescimento inicial de milho, soja e feijão cultivados em casa de vegetação. Estes autores constataram que, em soja, o extrato de milheto diminuiu o comprimento do hipocótilo e da radícula, no entanto, em feijão, aumentaram. O extrato do milheto reduziu a porcentagem e a velocidade de germinação em feijão e ainda reduziu a colonização micorrízica e o número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares em soja, milho e feijão. PARTELLI et al. (2010) observaram que o cultivo de milheto (*Pennisetum glaucum* cv. ENA 1) na entrelinha de café auxiliou na supressão de plantas espontâneas durante o ciclo da cultura. O plantio de milheto (*Pennisetum glaucum*), precedendo a cultura da soja reduziu o acúmulo de massa seca e densidade de plantas daninhas, sendo que o efeito foi mais acentuado quando as deposições de palhada ocorreram até 15 dias antes da semeadura e nenhum efeito negativo foi observado na produtividade da cultura da soja (PEREIRA et al., 2010).

E não é apenas pelo efeito de supressão imposto pela palhada que agem como barreira física e liberam aleloquímicos atuando sobre daninhas que o uso de coberturas pode ser importante. Gramíneas em geral são excelentes opções para rotação com leguminosas como a soja, pois contribuem para quebra de ciclo de pragas e doenças as quais não são hospedeiras, reduzindo, assim, o inóculo para as safras seguintes. A rotação de culturas, como a soja e feijão com gramíneas como milho e brachiaria, tem sido adotada como um método cultural do controle de mofo-branco, um patógeno importante destas leguminosas (COSTA, 2002; ROUSSEAU et al., 2006). Extratos etanólicos de aveia, ervilhaca, feijão, milheto,

milho e trigo suprimiram a germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* atuando como fungicidas (DA SILVA et al., 2011).

A presença de cobertura sobre o solo em períodos de entressafra atua minimizando o impacto de gotas de chuva sobre o solo bem como do escoamento superficial proporcionado pelas enxurradas, reduzindo, assim, os efeitos da erosão. Outro fator importante é que após a decomposição, as culturas de coberturas contribuem para o aumento de matéria orgânica nos solos, tornando-os mais férteis. Cooperam ainda para a manutenção da temperatura média do solo mais baixa, uma vez que é um empecilho para a incidência de luz direta sobre a camada mais superficial, bem como na retenção de umidade deste.

Palhadas provenientes de gramíneas apresentam razão carbono por nitrogênio maior, o que torna sua decomposição pelos micro-organismos mais difícil. Do ponto de vista de fertilidade e conservação de solo, isso é bom, pois poderão cobrir e condicionar o solo por mais tempo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Além de produzirem palhada com maior razão carbono/nitrogênio do que em sucessões leguminosas/leguminosas, estas coberturas podem ainda funcionar como adubo verde. De fato, uma vez ceifadas, sofrem mineralização, disponibilizando diversos nutrientes na superfície do solo, e ainda contribuem para descompactação, pois a presença de suas raízes nas camadas mais profundas aumenta a densidade do solo bem como propiciam a sobrevivência de diversos micro-organismos, tornando-os microbiologicamente mais ricos.

2.3 *Euphorbia heterophylla*

2. 3.1 Biologia e interferência no cultivo da soja

A *Euphorbia heterophylla* L., conhecida popularmente como amendoim-bravo, leiteiro ou leiteira, flor-de-poetas ou ainda café-do-diabo, pertence à família das euphorbiaceas e é uma planta anual e lactescente (principal características das plantas desta família). Apresenta porte ereto, medindo de 30 a 80 cm de altura, apresenta folhas glabras ou levemente pubescentes, de forma bastante variável medindo de 4 a 10 cm de comprimento, sendo que as folhas inferiores apresentam disposição alternada e as superiores oposta. Muitas vezes têm uma base

esbranquiçada ou vermelho brilhante. Reproduz sexuadamente produzindo sementes e seus frutos apresentam três lóbulos que explodem quando maduros, dispersando as sementes de 2 a 5 m ou mais da planta-mãe (LORENZI, 2006). As sementes provenientes germinam rapidamente em temperaturas alternadas de 25 a 35° C. A emergência é maior quando as sementes estão entre 0-8 cm de profundidade (40 a 47%) e cai para 22% a 10 cm, 12% a 12 cm e zero a 14 cm. Esta capacidade de sair de tais profundidades aumenta a competitividade da daninha em relação à cultura e dificulta o controle de *E. heterophylla* (FAO, 2012).

Agressiva em regiões de clima quente, esta planta daninha tem centro de origem na América do Sul (DARLINGTON & WYLIE, 1955). É uma diploide (2n=28 cromossomos) que sofreu poliploidização (2n=56 cromossomos) em outros centros de dispersão para adaptação nas mais diversas regiões do mundo. Sementes recém-colhidas de áreas tropicais não apresentam dormência, mas a latência é comum durante temperaturas mais baixas do inverno. Trata-se de uma adaptação, pois plantas que dariam início ao crescimento no final da estação quente seriam mortas por temperaturas de inverno. As sementes germinam durante um período prolongado no campo e as plantas crescem muito rapidamente, por isso são muito competitivas com as culturas e podem cobrir completamente uma cultura de soja dentro de 2 a 3 semanas após a emergência. É citada como problema durante o ciclo de cultivo de legumes, pastagens e particularmente em soja, ervilha, milho e cana-de-açúcar (FAO, 2012).

No Brasil, *E. heterophylla* infesta mais de 25% dos campos de soja e é uma dicotiledônea com elevada incidência na região Sul, estando presente em 74% das áreas de soja na região do Planalto do Estado do Rio Grande do Sul (BIANCHI, 1996). KARAM et al. (1993) observaram significativas reduções de produtividade da soja, onde uma infestação de 42,5 plantas m² de *E. heterophylla* reduziu a produção em 30%, em média. É uma espécie alógama, produz até 3.000 sementes por planta e pode reduzir o rendimento de grãos da cultura da soja em até 80% (KISSMANN & GROTH, 1992). BIANCO et al. (2007) destacaram que essa planta daninha é um forte competidor por nutrientes com a soja, sobretudo no

estádio de florescimento, período em que a soja tem maior requerimento nutricional.

Para cada dia de ausência de *E. heterophylla* na cultura da soja, entre 5 e 44 dias após a emergência da cultura há um ganho diário de produtividade de 7,27 kg ha⁻¹. No entanto, em áreas onde é adotada baixa densidade de semeadura, a convivência de plantas daninhas numa densidade média de 25 plantas m⁻² com a soja do 17° até o 44° de emergência resultou numa perda diária de 5,15 kg ha⁻¹ em termos de produtividade de grãos (MESCHÉDE et al., 2002). E não é apenas pela competição por recursos com a cultura que o leiteiro causa prejuízo já que o látex pegajoso proveniente da seiva da planta daninha contamina os grãos de sujeira durante a colheita podendo aumentar seu conteúdo de umidade e a porcentagem de grãos ardidos, levando a menor remuneração da cultura (FAO, 2012).

Diversos herbicidas são utilizados no controle de *E. heterophylla*, incluindo o 2,4-D, aciflurofen, fomesafen, oxyflurofen, bentazon, lactofen, imazetapir, imazaquin, e chlorimuron. Herbicidas a base de triazina, como atrazina e metribuzin, podem dar controle aceitável por várias semanas (especialmente quando as chuvas são abundantes após a aplicação), mas raramente para a temporada completa. Uréias substituídas, tais como linuron e diuron, não possuem nenhum efeito sobre esta erva daninha (FAO, 2012). No entanto, a integração de uso, mecânica manual, cultural e herbicidas em sistemas de gestão bem planejada é a melhor abordagem para controle desta invasora.

2.3.2 Alelopatia no manejo de *Euphorbia heterophylla*

Sobre alternativas ao controle químico de *E. heterophylla*, pesquisas foram feitas no sentido do controle biológico pelo fungo *Bipolaris euphorbiae*. Apesar deste agente ter se mostrado promissor, estudos básicos de sua biologia e de interação com o hospedeiro para determinação das condições favoráveis para o crescimento e a esporulação do fungo e o estabelecimento de um método eficiente para a produção de biomassa ainda são necessários (PENARIOL et al., 2008). Neste contexto em busca de alternativas ao controle químico, o uso de culturas de

cobertura que apresentem potencial alelopático vem sendo empregadas ainda de forma incipiente.

O primeiro caso de resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil foi encontrado em *E. heterophylla* aos inibidores da ALS que depois passou a ser resistente também ao grupo dos inibidores da PROTOX e aos derivados de glicina e, mais recentemente, aos inibidores da EPSPsintase (TREZZI et al., 2005; HEAP, 2011). Tendo em vista a estes diversos casos de resistência aos diversos mecanismos de ação, o controle desta planta daninha tem se dado muitas vezes de forma insatisfatória. Como os aleloquímicos podem agir pelos mais variados e novos mecanismos de ação, o uso da alelopatia no manejo ou no controle de plantas daninhas se somam às alternativas existentes.

Inicialmente, ALMEIDA & RODRIGUES (1985) constaram que trigo, triticale, aveia, centeio, nabo, tremoço e colza inibem significativamente a germinação e crescimento de *E. heterophylla*, bem como de *Brachiria plantaginea* e *Cenchrus echinatus*. Mais tarde, GUSMAN et al. (1990) demonstraram que o citrionelol, constituinte do óleo essencial de espécies cítricas, também inibiu a germinação de sementes e o crescimento inicial desta invasora (*Euphorbia heterophylla*), apontando o potencial de redução e supressão de crescimento desta daninha por meio de alelopatia.

Em 2006, estudos conduzidos por TREZZI e colaboradores constataram que a palhada de sorgo, milho ou aveia, na superfície do solo, reduziram a velocidade de emergência e número de folhas de *E. heterophylla*. Eles atribuíram este resultado tanto ao efeito físico da palhada como à alelopatia. Os autores citam que o uso de culturas de cobertura poderia beneficiar a intervenção posterior com métodos químicos, ampliando o período em que estas plantas estão mais suscetíveis à ação de herbicidas. Resultados promissores foram encontrados por RIZZARDI (2007) na redução de infestação de *E. heterophylla* na cultura de soja e de outras plantas daninhas, como picão-preto, carrapichão em áreas precedidas pelo cultivo de aveia-preta. No mesmo trabalho, ainda se observou redução de infestação por carrapichão onde a cultura foi precedida por canola.

O extrato bruto de *Artemisia annua* reduziu a germinação de leiteiro (MAGIERO et al., 2009). Da mesma forma, extratos da parte aérea de aveia-branca e aveia-preta provocaram redução na germinação e no crescimento da radícula e do hipocótilo do azevém e do amendoim-bravo (HAGEMANN et al., 2010). Os mesmos autores citam ainda que houve efeito diferenciado em função do genótipo testado de cada espécie de aveia. Sobre o efeito de milho sobre *E. heterophylla*, pouco tem se discutido. É possível, portanto, a utilização da alelopatia como ferramenta de controle ou manejo cultural de diversas plantas daninhas, especialmente o leiteiro, minimizando os custos com herbicidas e obtendo níveis de controle mais satisfatórios que os obtidos com os manejos convencionais adotados hoje.

Em meio a estas evidências, ainda existem desafios persistentes no ramo da alelopatia para determinar, por exemplo, o mecanismo de ação dos compostos, isolar novos compostos, avaliar as interações ambientais e compreender a atividade destas substâncias no solo. Romper estas barreiras podem levar ao uso mais aplicado da alelopatia para melhorar a produção agrícola e desenvolver uma agricultura mais sustentável, incluindo o controle de plantas daninhas e de pragas através de rotações de culturas, manejo dos resíduos e uma variedade de abordagens no controle biológico (POPA, 2008).

3. OBJETIVOS

Diversos trabalhos citam o efeito prejudicial de plantas coberturas como o milho sobre o crescimento de plantas daninhas. No entanto, poucas pesquisas isolaram o efeito físico imposto pela palhada do efeito alelopático no crescimento, bem como identificaram e estudaram os compostos aleloquímicos presentes nestas plantas. Muitos trabalhos mencionam a redução de infestação por diversas plantas daninhas quando as culturas de interesse foram precedidas por culturas de cobertura. Apesar disso, não foram avaliados os possíveis efeitos de aleloquímicos oriundos destas plantas no metabolismo e crescimento de plantas daninhas.

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos da fração hidrometanólica, obtida da parte aérea de milho, sobre a planta daninha amendoim-bravo. Os objetivos específicos foram:

1. Avaliar o efeito da fração hidrometanólica de milho no crescimento de amendoim-bravo;
2. Verificar o efeito desta fração sobre o estresse oxidativo desta daninha através da mensuração da atividade da peroxidase solúvel e da peroxidação lipídica;
3. Analisar o efeito desta mesma fração sobre enzimas da via de síntese de lignina através da determinação da atividade de fenilalanina amônia liase e peroxidase ligada à parede celular;
4. Determinar o efeito deste extrato na viabilidade celular da raiz;
5. Determinar o efeito deste extrato no consumo de solução nutritiva e nitrogênio.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção de material biológico e cultivo

Sementes de *Euphorbia heterophylla* foram obtidas da AgroCosmos Ltda. Antes da incubação em sala de crescimento, elas foram germinadas em rolo por 5 dias em BOD a 25°C (± 2) e fotoperíodo de 12 h. Para tanto, as sementes foram dispostas em uma folha papel germitest CEL-060 e cobertas com mais uma, ambas umedecidas com água no volume de 2 vezes o peso do papel. Depois de germinadas, elas foram distribuídas em um sistema contendo um copo de capacidade 300 mL e uma circunferência de isopor com espessura 1,5 cm para suporte das plantas que tiveram os colos envolvidos por uma camada de esponja com o objetivo de fixá-la no isopor. Cada copo recebeu 250 mL contendo solução nutritiva utilizada por DONG et al. (2006) e seu respectivo tratamento em pH = 6,0, sendo esta renovada no 4, 7, 10 e 13º dia de incubação. Na sala de crescimento, cada sistema foi conectado a uma pequena mangueira ligada a uma linha central que distribuía o ar proveniente do compressor e, assim, garantia aeração constante. A temperatura da sala foi mantida constante a 25°C (± 2) e a intensidade luminosa era de 400 μmol s de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Este período de incubação durou 15 dias.

4.2 Cultivo e obtenção da palhada de milho

O milho (cv. ADR-300) foi semeado em campo aberto na Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá, distrito de Iguatemi, Paraná, Brasil (S 23 21; W 52 04), em espaçamento 0,50 metros entre linhas, contendo de 25 à 30 sementes por metro linear de semeadura, em março de 2011. Previamente, amostras de solo da área foram coletadas para caracterizar as propriedades físico-químicas que correspondem a pH = 5,5, 79% de areia, 3% de silte, 18% de argila e 10,62 g dm^{-3} de carbono orgânico. Oitenta dias após a emergência, a parte aérea foi colhida, triturada e seca em estufa a 40°C durante 24 h.

4.3 Obtenção do extrato hidrometanólico de milho

Experimentos prévios a fim de avaliar o potencial alelopático de cada fração mostraram que o extrato hidrometanólico foi mais ativo sobre espécies daninhas, milho e soja. Portanto, esta fração foi definida como a de trabalho (MARCHIOSI, 2012).

Seiscentos e cinquenta gramas de massa seca proveniente da palhada de milho foram submetidos à maceração com metanol, resultando, após a evaporação do solvente em rotavapor, um extrato metanólico bruto. Este extrato bruto foi dissolvido em uma solução água/metanol (3:1) e fracionado três vezes por ordem de polaridade em 150 mL de cada um dos seguintes solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. O resíduo obtido após esta extração com o butanol, último na ordem de partição, é o que chamamos de extrato hidrometanólico que, então, foi liofilizado para retirada de umidade (Figura 1).

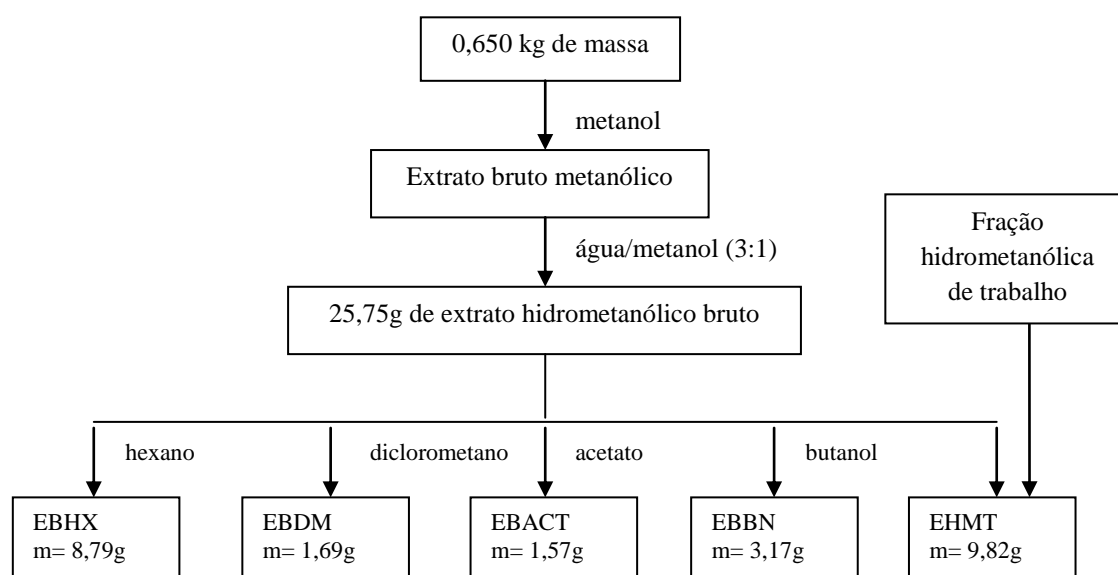


Figura 1. Fluxograma de fracionamento da palhada de milho e obtenção da fração hidrometanólica de trabalho. EBHX= extrato bruto hexânico. EBDM= extrato bruto diclorometano. EBACT= extrato bruto acetato. EBBN= extrato bruto butanólico. EHMT= extrato hidrometanólico de trabalho.

4.4 Delineamento experimental e estatística

Experimentos realizados para avaliação das atividades de enzimas, exceto a PAL (fenilalanina amônia liase), e variáveis biométricas, foram montados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 tratamentos e 6 repetições

cada, sendo que os tratamentos foram compostos por controle, com somente solução nutritiva, e quatro doses crescentes (250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹) de extrato hidrometanólico. Os dados de atividades de enzimas (exceto a PAL), peroxidação lipídica, viabilidade celular e das variáveis biométricas foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de variância comum dos erros de Levene e, então, submetidos à análise de variância (ANOVA) e de regressão linear por polinômios p -valor<0,05. As variáveis viabilidade celular e mortalidade de plantas, que não se ajustaram à regressão linear, foram submetidas à regressão não linear.

As variáveis dependentes consumo de solução nutritiva e nitrogênio da solução em função de duas variáveis independentes: doses de extrato (0, 250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹) e dias de incubação (4, 7, 10, 13 e 15), formaram uma regressão múltipla e tiveram os modelos selecionados pelo método passo-atrás (“back-ward”) (p -valor <0,05).

O experimento para medir a atividade da PAL foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 2 tratamentos (0 e 500 mg L⁻¹) com 5 repetições que também foram submetidos ao teste de normalidade dos dados e variância comum dos erros, seguidos de ANOVA (p -valor <0,05), cujo o teste F é conclusivo quando existe apenas 2 tratamentos.

Para as análises qualitativas em microscópio eletrônico de varredura, nenhum tratamento estatístico foi empregado.

4.4 Obtenção do extrato genérico para avaliação da atividade de enzimas

Raízes conservadas em nitrogênio líquido foram pesadas em balança digital de quatro casas, e maceradas a 4°C com tampão fosfato de potássio 100 mM pH= 7,5 contendo 1 mM de EDTA e 3mM DTT e 4% de PVP (p/v) com volume 1,5 vez o peso de massa obtido. Este homogeneizado foi centrifugado a 10000 rpm por 30 min a 4°C e o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C para mensurar as atividades das enzimas (AZEVEDO et al., 1998).

4.5 Atividades das enzimas

4.5.1 Atividades de enzimas da via dos fenilpropanoides

4.5.1.1 Determinação da atividade da PAL

Para medir a atividade da PAL, 0,250 mL do extrato genérico e 1 ml de tampão de borato de sódio 0,1 M, pH 8,7 foram aquecidos a 40° C, por 5 minutos em banho-maria. Passado esse curto período de aquecimento, foi adicionado 0,300 mL de L-fenilalanina 50 mM para iniciar a reação, que foi interrompida após uma hora de incubação pela adição de 50 µl de HCl 5 M (FERRARESE et al., 2000).

Para medida da atividade da enzima, estas amostras foram filtradas através de um filtro de seringa descartável de 0,45 µm e 20 µl de cada amostra foi injetado e analisado em Cromatógrafo Shimadzu® (Tóquio, Japão) equipado com bomba LC-10AD, um injetor Rheodine®, detector UV SPD-10A, módulo de comunicação de barramento CBM-101, e estação de trabalho Class-CR10. A fase reversa Shimpack® GLC-ODS (M) (150 x 4,6 mm, 5 mm) foi utilizada em temperatura ambiente, com um equivalente de pré-coluna (10 x 4,6 mm). A fase móvel utilizada foi metanol:água (70:30), com uma taxa de fluxo de 0,5 ml min⁻¹ em comprimento de onda 275 nm. A coleta de dados e integração da área dos picos foram realizados pelo software Class-CR10 (Shimadzu®, Tóquio, Japão).

O produto da reação da PAL, *t*-cinamato, foi então identificado por comparação do seu tempo de retenção com um padrão a 10 µM. A atividade da PAL foi então expressa em nmol *t*-cinamato produzido h⁻¹ g⁻¹ de proteínas.

4.5.1.2 Determinação da atividade da POD ligada (peroxidase ligada à parede celular)

Para isolamento da peroxidase ligada à parede celular, o precipitado restante da centrifugação para obtenção da POD solúvel foi lavado com água deionizada até que fosse detectada, no sobrenadante, atividade da POD ligada. O precipitado foi então incubado com 2 mL de NaCl 1M por 1 h a 4°C e depois homogeneizado e centrifugado a 4000 rpm por cinco minutos. Deste sobrenadante,

foi isolada a peroxidase que estava ligada ionicamente a parede celular. Da mesma forma que a POD solúvel, a atividade foi lida em 470 nm de absorbância, após reação de cinco minutos de 0,2 mL de extrato diluído no NaCl e 1,3 mL do meio de reação contendo tampão fosfato 25 mM pH= 6,8, água oxigenada e guaiacol (HERRIG et al., 2002).

4.5.2 Efeito sobre o estresse oxidativo

4.5.2.1 Determinação da atividade da POD solúvel (peroxidase solúvel, dependente de guaiacol)

Para medir a atividade da POD solúvel (EC 1.11.1.7) dependente de guaiacol, o extrato genérico foi centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado como extrato de POD solúvel. A reação seguiu o descrito em HERRIG et al. (2002), ou seja, 0,2 mL deste extrato diluído em tampão fosfato 67 mM pH = 7,0 reagiu por cinco minutos com 1,3 mL de meio de reação contendo tampão fosfato 25 mM pH = 6,8, água oxigenada 10 mM e guaiacol 2,50 mM, que teve a absorbância lida em 470 nm. Após 5 minutos de oxidação do guaiacol, a atividade da enzima foi calculada em função do coeficiente de extinção do tetraguaiacol (25,5 mM⁻¹), e expressa em μmol de tetraguaiacol min⁻¹ g⁻¹ de proteínas.

4.5.2.2 Determinação dos produtos da peroxidação lipídica: conteúdo de malondialdeídos (MDA)

Para medir o nível de peroxidação lipídica das raízes, 0,5 g de massa fresca foi macerado com 5 mL de tampão fosfato 67 mM pH = 7 e centrifugados por cinco minutos em 4000 rpm a 4°C. Uma alíquota de 0,5 mL de extrato enzimático foi incubado em tubo de ensaio com 2 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA), 0,5%, preparado em 20% de ácido tricloacético, e levado ao banho-maria a 90° C, por 10 minutos. Ao final deste período, a reação foi interrompida em banho de gelo durante 15 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 3500 rpm por cinco minutos e a absorbância do sobrenadante, onde se formou o complexo colorido

MDA-TBA, foi lida a 532 nm em espectro. O valor obtido foi subtraído de uma absorbância inespecífica obtida em 600 nm. O conteúdo de MDA foi calculado a partir do coeficiente de extinção $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (DOBLINSKI et al., 2003).

4.6 Dosagem de proteínas

A atividade de todas as enzimas foi expressa em função da quantidade de proteínas. Para dosagem de proteínas pelo método de BRADFORD (1976), foi utilizado o mesmo extrato genérico usado para avaliação de cada atividade. Para tanto 50 μl de extrato genérico diluído reagiram por cinco minutos com 2,5 mL do reagente de Bradford, e a leitura foi realizada em 595 nm. O valor de absorbância foi então comparado com albumina padrão 50 mg% e então obtida a quantidade de proteínas em mg% da amostra.

4.7 Viabilidade celular

A análise de viabilidade celular foi realizada segundo o proposto por GAFF e OKONG 'O-OGOLA (1971). Raízes provenientes das plantas tratadas por 15 dias foram imersas em azul de Evans 0,25% por 15 minutos e então lavados com água destilada. As regiões coradas foram então acondicionadas em tubo ependorff contendo 1 mL de dimetilformamida por 50 minutos. Em seguida, procedeu-se a leitura em espectro da solução contida no ependorff a 600 nm.

4.8 Variáveis biométricas

4.8.1 Comprimento da raiz e parte aérea

Após o período de tratamento, o comprimento da raiz e do caule foi tomado com auxílio de uma régua de 30 cm, sendo que a raiz foi obtida medindo-se do ápice até o colo da planta e a parte aérea do colo até o meristema apical.

4.8.2 Espessura do caule

Para mensurar a espessura do caule, foi utilizado um paquímetro digital e ao final do período de incubação esta medida foi tomada na base do colo de cada planta.

4.8.2 Área foliar

Para medida de área foliar, foi adotado o fator de multiplicação proposto por DUARTE et al. (2009). Assim, foi tomado o comprimento da nervura central (C) e da máxima largura (L), que , multiplicados pelo fator 0,6816, deram origem a área foliar, conforme a equação: $Af = 0,6816 \cdot (C \cdot L)$, onde Af corresponde área foliar estimada em cm².

4.8.3 Massa fresca e seca da raiz e parte aérea

Após o período de tratamento, as plantas foram retiradas do sistema e separadas em raiz e parte aérea. Imediatamente, a massa fresca foi tomada em balança digital de quatro casas. Raiz e parte aérea foram levadas a estufa de ventilação forçada a 60°C até que fosse atingido peso constante. Para mensurar a massa seca então, foram retiradas da estufa e levadas a um dessecador para resfriamento e retirada da umidade, e a massa tomada.

4.8.4 Número de folhas por planta

O número de folhas foi obtido também ao final do período de 15 dias de incubação contando-se as folhas completamente expandidas. Foram consideradas completamente expandidas aquelas onde as bordas do limbo não mais se tocavam.

4.8.5 Número de nós por planta

O número de nós de plantas se deu pela simples contagem de nós visíveis na região do caule.

4.8.6 Mortalidade de plantas

Ao final do período de incubação, foi realizada a contagem do número de plantas incubadas que não sobreviveram ao tratamento, e que constituíram as plantas mortas.

4.9 Consumo de solução nutritiva e de nitrogênio

4.9.1 Consumo de solução nutritiva

O volume consumido de solução nutritiva foi tomado a cada renovação de solução utilizando uma proveta graduada de 250 mL. Considerando que a cada sistema foi adicionado um volume total de 250 mL de solução por tratamento, a diferença entre o volume adicionado e restante constituiu o volume de solução consumido por sistema em mL.

4.9.2 Consumo de amônia da solução

A amônia livre em solução foi medida conforme WEATHERBURN (1967). Para isto, 200 µL de solução nutritiva foram adicionados em tubo de ensaio juntamente com 1,25 mL de solução de fenol (1%) e nitruoprussiato de sódio (0,005%) e 1,25 de solução hidróxido de sódio (0,5%) com hipoclorito (0,126%) e levado a banho-maria por 20 minutos a 37°C. As absorvâncias foram obtidas em 490 nm quando atingido a temperatura ambiente. Como a solução foi renovada aos 4, 7, 10, 13 e 15 dias de incubação, a cada troca, o teor inicial e final de incubação foi mensurado e indiretamente foi obtido o consumo de amônia. Os resultados foram convertidos em teores de N-NH_4^+ na solução, com o auxílio de uma curva de calibração preparada a partir de soluções diluídas de sulfato de amônio, que receberam o mesmo tratamento dado às amostras.

4.9.3 Consumo de nitrato da solução

O consumo de nitrato por *E. heterophylla* também foi medido indiretamente a cada troca de solução. Uma alíquota da solução de incubação nova e a que seria descartada de cada repetição teve o teor de nitrato em solução avaliado, conforme sugerido por CATALDO et al. (1975). Neste rápido teste colorimétrico, 20 µL da solução de incubação reagiram por 20 minutos em temperatura ambiente com 80 µL de ácido salicílico 5% em ácido sulfúrico concentrado. Após a reação, foram adicionados 1,9 mL de NaOH 2 M, elevando, assim, o pH acima de 12. A absorvância da mistura resultante foi então analisada a

410 nm. Descontando a concentração inicial de nitrato e final de cada troca de solução (4, 7, 10, 13 e 15 dias de incubação), obteve-se indiretamente o consumo de nitrato por planta, em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Os resultados foram convertidos em teores de N-NO_3^- na solução, com o auxílio de uma curva de calibração preparada a partir de soluções diluídas de nitrato de potássio, que receberam o mesmo tratamento dado às amostras.

4.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Qualitativamente, raiz, caule e folha foram analisados em microscópio eletrônico de varredura. Para estas análises morfoanatômicas, pequenas secções de raízes, caules e folhas foram fixadas em ependorff contendo solução de Karnovsky modificada (2,5% glutaraldeído e 2% paraformaldeído em tampão cacodilato 0,05 M, pH = 7,2), onde foram armazenadas em refrigerador até o momento de análise. No dia anterior a análise, a amostra foi desidratada em acetona (MAUNSBACH & AFZELIUS, 1999) e, momentos antes da observação em microscópio, a acetona presente nos tecidos foi substituída por gás carbônico liquefeito na câmara do aparelho de ponto crítico de CO_2 , depois metalizadas com ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu SS550) (SILVEIRA, 1989).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sobre o efeito do extrato no metabolismo secundário, foi observado redução dos níveis de peroxidação com incrementos das doses (Figura 2A). Da mesma forma, a POD solúvel, uma enzima antioxidante ativa no citosol que protege as células da influência destrutiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), teve sua atividade diminuída com o incremento das doses (Figura 2B), indicando, assim, uma possível redução na produção de EROs pelas plantas tratadas.

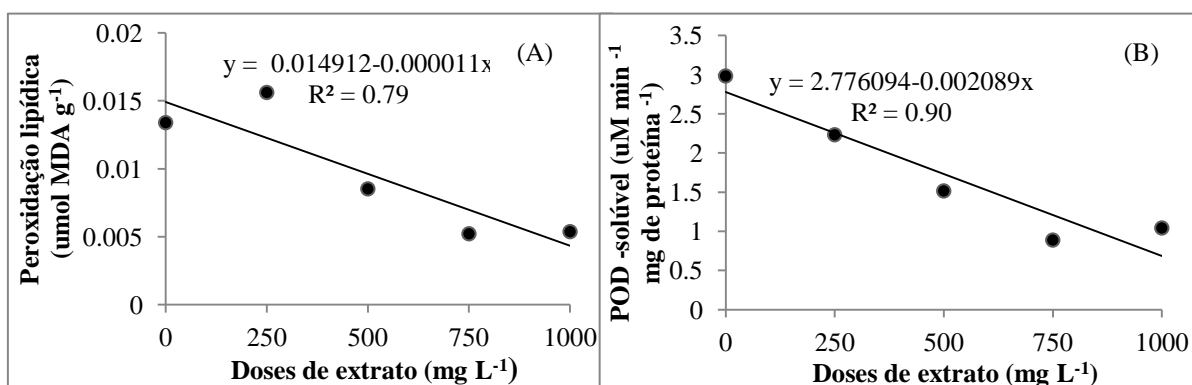


Figura 2. (A) Efeito do extrato hidrometanólico de milho sobre a peroxidação lipídica e (B) sobre a atividade da POD solúvel dependente de guaiacol de plantas de *Euphorbia heterophylla* ($p < 0.05$).

Como a peroxidação lipídica e a atividade da POD solúvel reduziram, é possível assumir que a fração hidrometanólica de milho não provoca estresse oxidativo nas plantas de *E. heterophylla*, podendo até mesmo agir de forma protetora (antioxidante) contra as formas de EROs.

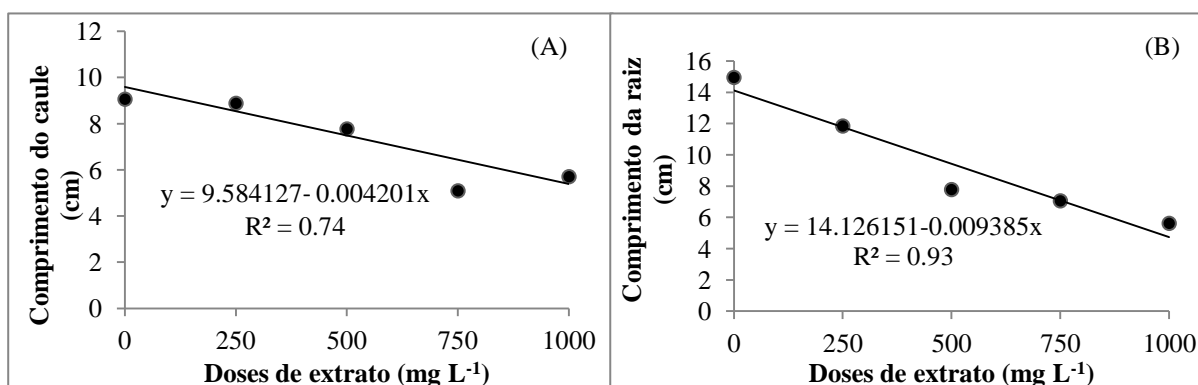


Figura 3. (A) Efeito do extrato hidrometanólico de milho sobre o comprimento do caule e (B) sobre o comprimento da raiz de plantas de *Euphorbia heterophylla* ($p < 0.05$).

Assim como o observado por SAXENA et al. (1996) que estudaram a autotoxicidade de milho (*Pennisetum glaucum*) cv. MH 179, todas as variáveis relacionadas ao crescimento de *E. heterophylla*, como comprimento de raiz e caule, espessura do caule, área foliar, número de nós e folhas por planta, massa fresca e seca da raiz e parte aérea, foram diminuídas com incremento das doses de extrato hidrometanólico de milho (Figuras 3, 4, 5 e 6).

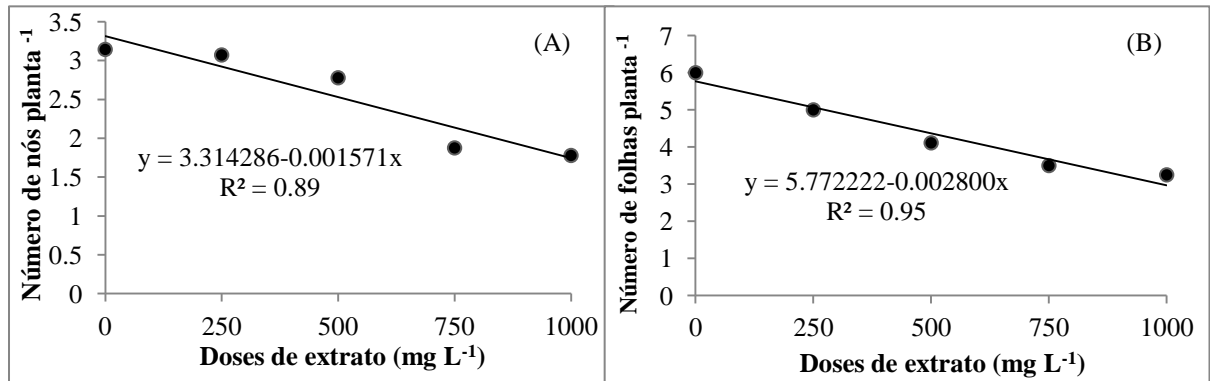


Figura 4. (A) Efeito do extrato hidrometanólico de milho sobre o número de nós e (B) número de folhas por planta de *Euphorbia heterophylla* ($p < 0.05$).

A diminuição de número de nós e folhas (Figura 4) indica uma redução do estágio vegetativo das plantas devido à interferência na organogênese, mostrando, assim, efeito de supressão de crescimento tão comumente citado em trabalhos a campo, utilizando coberturas no manejo de plantas daninhas. TREZZI et al. (2006) também verificaram a redução no número de folhas em leiteiro imposta por palhada de sorgo, aveia e milho e atribuíram este efeito tanto à barreira física estabelecida pela palhada quanto à atividade alelopática. De certa forma, é mais fácil supor que o impedimento ao crescimento da planta daninha no campo ocorra devido à barreira infligida pela palhada, pois o tratamento é visível. Estudos com frações da cobertura de interesse separam o fator físico e isolam o fator alelopático, confirmando, assim, a possibilidade sugerida por TREZZI et al. (2006) de que tenha ocorrido alelopatia.

Menor crescimento de raiz e, conseqüentemente, da parte aérea, bem como a redução de espessura do caule (Figura 4 e 5B), ocasionaram menor acúmulo de massa fresca e seca da raiz e parte aérea (Figura 6) e menor índice de área foliar (Figura 5A).

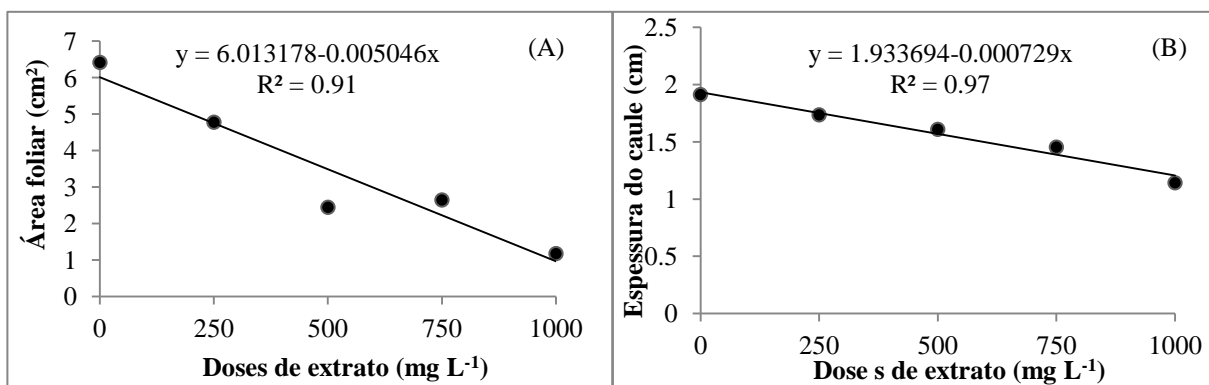


Figura 5. (A) Efeito do extrato hidrometanólico de milho sobre a (B) área foliar e espessura do caule de plantas de *Euphorbia heterophylla* ($p < 0.05$).

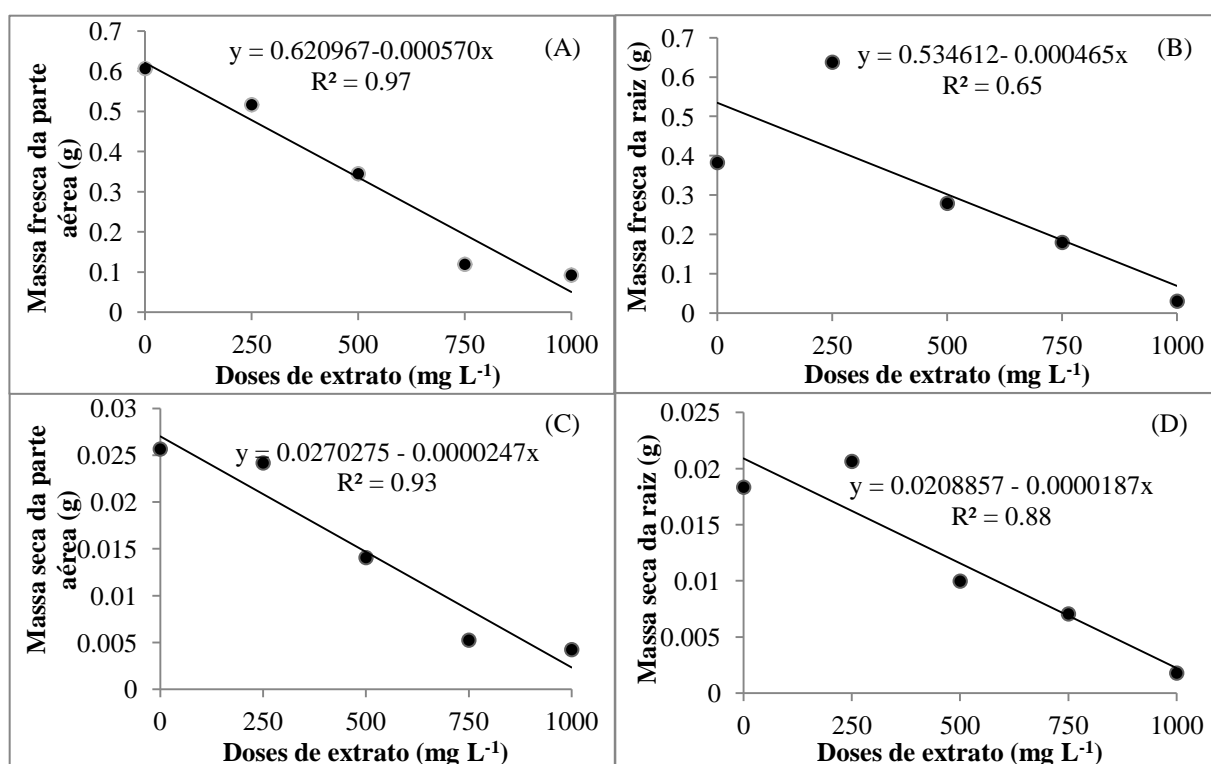


Figura 6. (A e C) Efeito do extrato hidrometanólico de milho sobre a massa fresca e seca da parte aérea e (B e D) raiz de plantas de *Euphorbia heterophylla* ($p < 0.05$).

A variável mortalidade de plantas, por sua vez, não apresentou relação linear de incremento de doses (Figura 7). Para este parâmetro, foi possível ajustar uma curva de dose-resposta sigmoideal de Boltzmann similar a proposta por KUVA et al. (2000), que seguem a fórmula geral $y = A / (1 + \exp((x - C_{50})/D))$, onde: A representa a maior dose onde não houve fitotoxicidade; D, a declividade; e C_{50} , a dose do herbicida necessária para causar 50% de mortalidade nas plantas (adaptado de SEEFELDT et al., 1995).

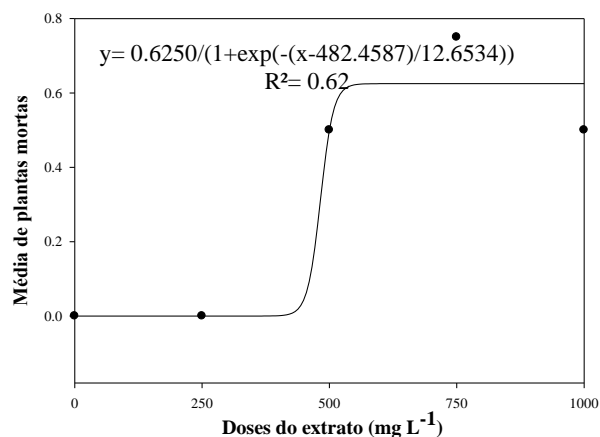


Figura 7. Efeito do extrato hidrometanólico de milho sobre a mortalidade de plantas de *Euphorbia heterophylla* ($p < 0,05$).

Assim, a dose de extrato necessária para reduzir 50% do estande de plantas (C_{50}) foi $482,46 \text{ mg L}^{-1}$. Nota-se que o ponto máximo da curva ocorre em concentração de extrato próxima a 500 mg L^{-1} , dose próxima da C_{50} , indicando, assim que o máximo de controle obtido pelo extrato hidrometanólico de milho é também próximo a 50% nas condições testadas.

Aliando a taxa de mortalidade (Figura 7) aos dados de número de nós e folhas por planta (Figura 4), temos uma informação importante. No controle de plantas daninhas, o estágio vegetativo em que estas se encontram tem extrema relevância. Quando adotado controle químico, a maioria das recomendações sugere que a aplicação seja feita até o estágio de 3-4 folhas para dicotiledôneas (GAZZIERO et al., 2006; RAMIRES et al., 2006). Ao final dos 15 dias de incubação, as plantas controle apresentaram 3 folhas, enquanto as tratadas na maior concentração tinham cerca de 2 folhas expandidas. Desta forma, a supressão de crescimento imposta pelo extrato de milho pode contribuir para manutenção do leiteiro nos estádios suscetíveis por mais tempo, facilitando, assim, o controle químico. Plantas daninhas controladas em estádios mais jovens garantem maior índice de mortalidade de plantas e menores taxas de reinfestação, bem como menor uso de herbicidas e misturas, o que implica em menor custo com controle químico, menor contaminação do ambiente e menor pressão de seleção da população resistente (MOREIRA et al., 2010).

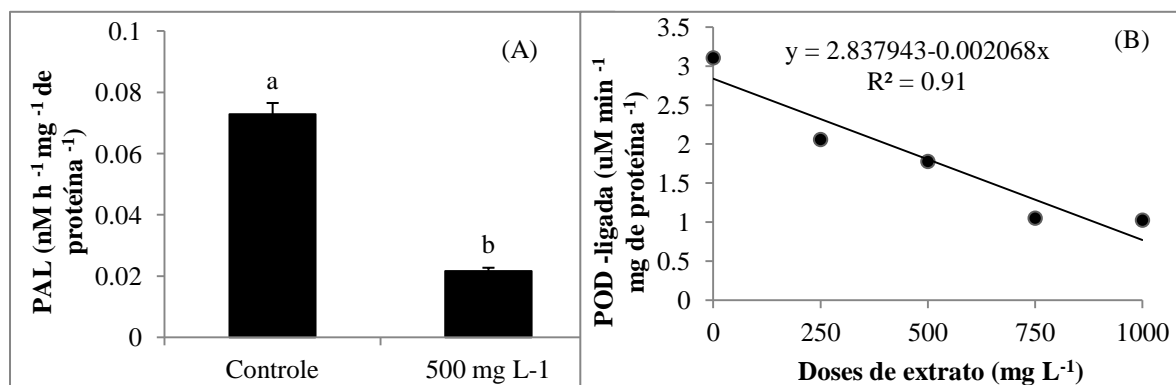


Figura 4. (A) Efeito do extrato hidrometanólico de milho sobre a atividade da PAL pelo teste F mais barra de erros e (B) da POD ligada à parede celular de plantas de *Euphorbia heterophylla* ($p < 0.05$).

Enzimas da rota de fenilpropanoides como a PAL, primeira enzima da via de biossíntese de lignina e flavonoides, que age desaminando *L*-fenilalanina para formação de *t*-cinâmico (JONES, 1984), e a POD ionicamente ligada à parede celular, responsável pela polimerização oxidativa de monolignóis, tiveram as atividades reduzidas com incrementos da dose de extrato (Figura 4).

Dos Santos et al. (2008b) encontraram aumento da atividade das enzimas da via dos fenilpropanoides nas plantas tratadas com ácido ferúlico bem como dos teores de lignina e atrelaram a redução de crescimento a maior lignificação dos tecidos causada pela esterificação do ferúlico à parede celular, o que seria um impedimento da expansão celular. O extrato hidrometanólico de milho, por sua vez, reduziu a atividade da PAL e POD ligada à parede celular, mas ainda assim o crescimento das plantas foi afetado. Desta forma, a redução de crescimento das plantas tratadas não parece ser efeito direto do extrato sobre a via da lignificação.

Plantas que tiveram seu crescimento prejudicado em função do dano na raiz e a divisão celular acelerada poderiam apresentar menor atividade da enzima PAL em função da menor disponibilidade de produto (JONES, 1984). Em consequência da menor atividade da PAL, menos ácido cinâmico é formado e assim, a POD ligada à parede celular, última enzima da via dos fenilpropanoides, teria menos produto para oxidar, culminando em sua menor atividade enzimática.

Apesar do aparente efeito protetor desta fração a EROs, a viabilidade celular da raiz foi afetada, sobretudo em doses maiores que 250 mg L⁻¹ (Figura 6). A curva gerada por meio de regressão não linear mostra que incrementos da dose

em até 500 mg L⁻¹ resultaram em pouca variação de efeito negativo na viabilidade celular. A partir desta dose, a viabilidade diminui (absorbância aumenta) numa taxa bem superior às doses menores, sendo altamente afetada em 1000 mg L⁻¹.

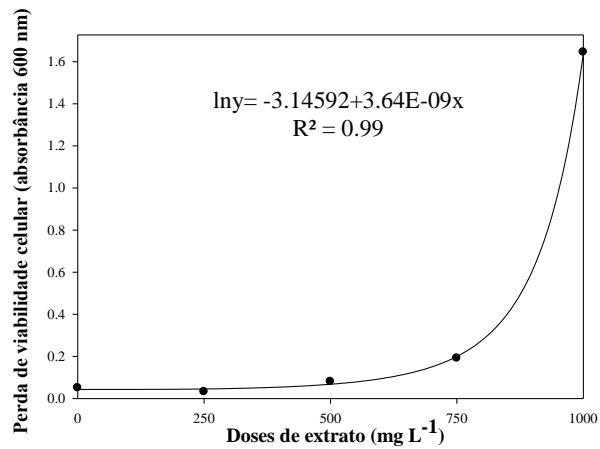


Figura 6. Efeito do extrato hidrometanólico de milho sobre a perda de viabilidade celular de plantas de *Euphorbia heterophylla* ($p < 0.05$).

Imagens obtidas da raiz por meio de microscopia eletrônica de varredura para 500 mg L⁻¹ de extrato hidrometanólico de milho mostram que estas foram extramente comprometidas pelo tratamento (Figura 7). É possível que danos na membrana promovidos pela absorção de extrato nas células mais superficiais reflitam na perda de viabilidade que foi incrementada com as doses de extrato.

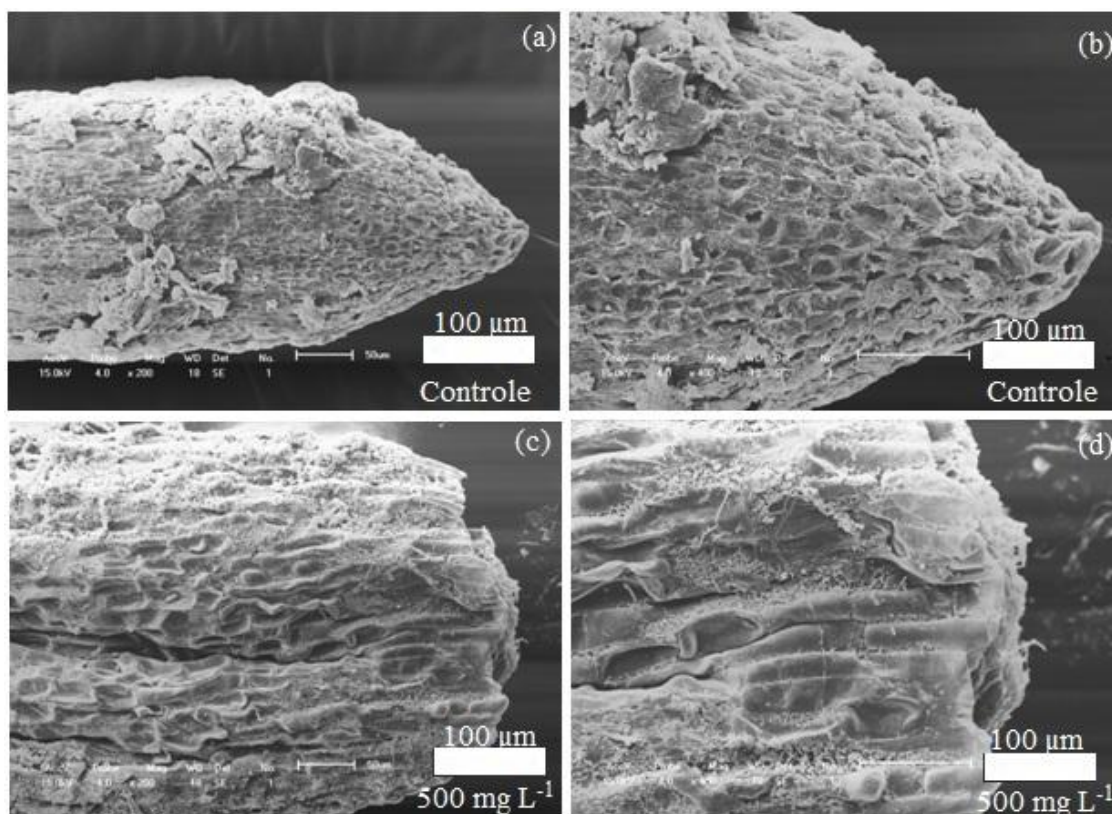


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura do ápice radicular de *Euphorbia heterophylla* tratadas com extrato hidrometanólico de milho (c-aumento de 200x e d-aumento de 400x) em comparação com controle (a-aumento de 200x e b-aumento de 400x).

Além do aspecto deteriorado dos tecidos superficiais da raiz, foi possível observar modificações no tecido da coifa e da região de alongamento, sendo que a coifa das raízes tratadas de *E. heterophylla* se mostrou menor e mais abaulada (Figuras 7C e D) que as do controle (Figuras 7A e B) e a região de alongamento, por sua vez se mostrou mais intumescida e curta nas raízes submetidas ao extrato.

Trabalho conduzido por dos SANTOS et al. (2008b) mostrou que o ácido ferúlico, um derivado hidroxicinâmico, acelerou a divisão celular fazendo com que os elementos de vasos se desenvolvessem precocemente, dando origem a raízes com maior diâmetro e intumescidas devido à produção de cilindro vascular maior. Da mesma forma, alguns herbicidas agem acelerando a divisão celular, pois promovem a acidificação da parede celular através do estímulo da atividade da bomba de H^+ ATPase ligada à membrana celular. Assim, ativam o metabolismo da planta, causando seu esgotamento pela indução de produção de proteínas e enzimas que seriam utilizadas durante o crescimento (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2011).

Durante a divisão celular desordenada mais auxina e giberelina são sintetizadas, levando acidificação da parede celular e a produção de etileno (TAIZ & ZEIGER, 2013). O alongamento é, então, induzido pelo aumento da atividade de enzimas responsáveis pelo afrouxamento celular como a celulase, que é estimulada pela liberação de etileno (AHRENS, 1994; TAIZ & ZEIGER, 2013). À medida que outras funções metabólicas são afetadas, e o metabolismo geral e as funções celulares normais são interrompidas e mais etileno é liberado, causando paralisação do crescimento e engrossamento de raízes (intumescimento).

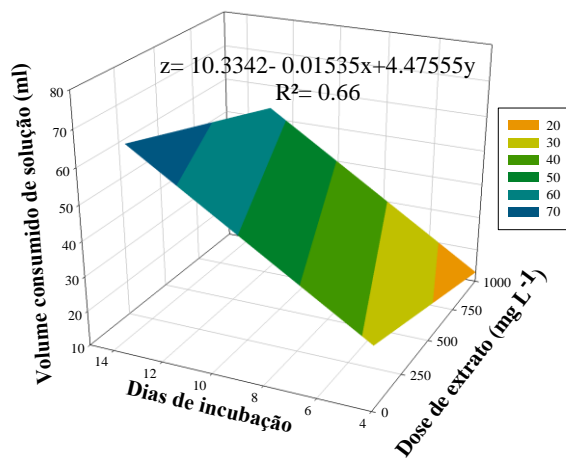


Figura 8. Consumo de solução nutritiva por *Euphorbia heterophylla* durante o período de incubação em função das doses de extrato. z = volume consumido (ml); x = dose de extrato (mg L^{-1}); y = tempo de incubação (dias).

O consumo de solução nutritiva durante o período de incubação foi afetado tanto pelo extrato como pelo dias de incubação. Com avanço dos estádios de crescimento, a raiz ganha maior área de absorção bem como maior superfície de transpiração em si, mas, como o crescimento é sempre reduzido em função das doses de extrato, a absorção de solução é sempre menor à medida que se incrementa a concentração deste (Figura 8). O crescimento e extensão celular são eventos dependentes de água, uma vez que a redução da turgidez prejudica a expansão celular. A inibição desse crescimento em extensão diminui a área foliar e leva a restrições no acúmulo de biomassa, limita o número de folhas, bem como o crescimento do caule (OSÓRIO et al., 1998). Assim, reduções nos variáveis de crescimento e acúmulo de massa seriam também consequência da redução de absorção de água e de nutrientes. O mesmo comportamento foi observado para o consumo de amônia na solução (Figura 9).

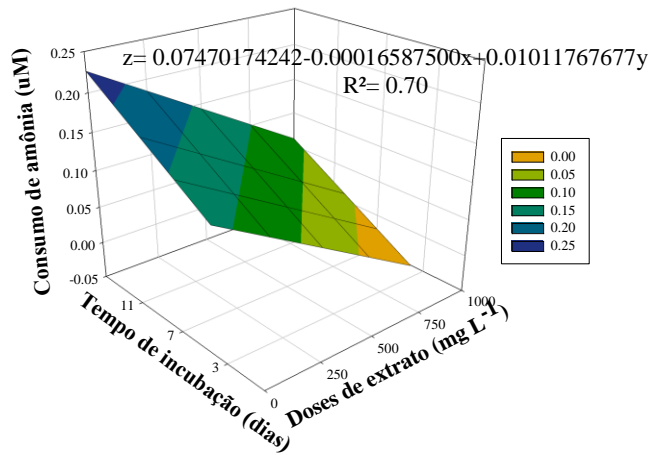


Figura 9. Consumo de amônia por *Euphorbia heterophylla* durante o período de incubação em função das doses de extrato. z = amônia consumida (μM); x = dose de extrato (mg L^{-1}); y = tempo de incubação (dias).

Sobre o nitrato, o mínimo de captação em doses próximas de 500 mg L^{-1} independentemente do tempo de incubação (Figura 10). Em doses a partir de 500 mg L^{-1} , o consumo de nitrato passa a aumentar, sendo que o máximo de consumo é atingido em 1000 mg L^{-1} . SEGONZAC et al. (2007) constataram em *Arabidopsis* a possibilidade de efluxo de nitrato de dentro do compartimento celular para o meio em condições de estresse. A metodologia adotada para mensuração de absorção de nitrato se dá de forma indireta, ou seja, esse valor é tomado em relação à quantidade desse nutriente que sobra na solução em cada período de tempo. Assim, é possível que a ideia de menor consumo de nitrato, identificado, então, pela maior concentração deste elemento na solução, seja somente um falso positivo em função do efluxo de nitrato de dentro das células da raiz.

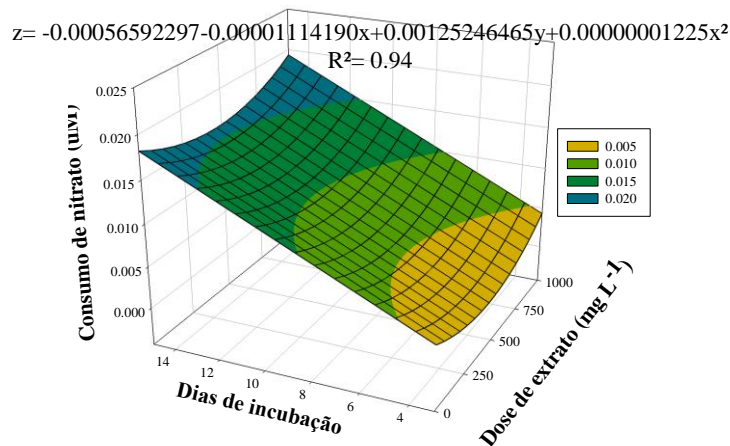


Figura 10. Consumo de nitrato por *Euphorbia heterophylla* durante o período de incubação em função das doses de extrato. z = nitrato consumido (μM); x = dose de extrato (mg L^{-1}); y = tempo de incubação (dias).

Foi constatado que, a partir de 500 mg L^{-1} , a perda de viabilidade celular da raiz aumenta drasticamente. Esse tipo de dano pode contribuir para o efluxo de nitrato para o meio, cooperando para maior concentração de nitrato na solução de incubação. Danos na membrana prejudicam o sistema de transporte de íons, inclusive o de nitrato de amônia, bem como a absorção de água e seus eventos dependentes, como a expansão e divisão celular, que levam ao crescimento da planta (TAIZ & ZEIGER, 2013).

É possível supor que a queda na captação de amônia leve a um compensamento na obtenção de nitrogênio pelas plantas através do incremento da absorção de nitrato, sendo que o de absorção de nitrato cai em doses maiores que 500 mg L^{-1} em função do efluxo desse elemento de dentro das células, que são sobretudo mais afetadas em doses iguais ou superiores a essa do extrato.

6. CONCLUSÕES

1. O crescimento de *Euphorbia heterophylla* foi drasticamente afetado pelo extrato representado pela redução de todas as variáveis de crescimento avaliadas;
2. A fração não causou estresse oxidativo na daninha, pois não foi observado incremento da atividade da peroxidase solúvel e da peroxidação lipídica com incrementos das doses de extrato;
3. Aditividade das enzimas PAL e peroxidase ligada a parede celular foram reduzidas com incremento das doses, indicando efeito negativo da dose de extrato na rota de fenilprapanoides;
4. Concentrações do extrato, especialmente as maiores que 500 mg L⁻¹, levaram a extrema perda da viabilidade celular do ápice radicular de leiteiro, danos esses que foram confirmados pela microscopia de varredura do ápice; e,
5. Plantas submetidas ao extrato apresentaram redução na captação de amônia e solução nutritiva, além de modificações no padrão de absorção de nitrato.

7. REFERÊNCIAS

- AHRENS, W. H. (Ed.). **Herbicide handbook**. Champaign: Weed Science Society of America, 1994. 352 p.
- ALDRICH, R. J. **Weed crop ecology: principles in weed management**. Belmont: Breton Publishers, 465p., 1984.
- ALMEIDA, F. S., RODRIGUES, B. N. Plantio Direto. In: **Guia de Herbicidas: Contribuição para o uso adequado em plantio direto e convencional**. Londrina, IAPAR, p.341-399, 1984.
- AMIN, W. G., MELLO, S. P. Avaliação da qualidade das silagens de girassol, milho, sorgo e milheto em diferentes espaçamentos. **Nucleus Animalium**, v. 1, n. 1, 2009.
- AZEVEDO, R. A., ALAS, R. M., SMITH, R. J., LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wildtype and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280-292, 1998.
- BAIS, H. P., VEPACHEDU, R., GILROY, S., CALLAWAY, R. M., VIVANCO, J. M. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. **Science**, v. 301, p. 1377-1380, 2003.
- BARNES, J. P., PUTNAM, A. R. Rye residues contribute weed suppression in no-tillage cropping systems. **Journal of Chemical Ecology**, v. 9, p. 1045-1057, 1983.
- BELZ, R.G. Allelopathy in crop/weed interactions – an update. **Pest Management Science**, v.63, p.308-326, 2007.
- BHOWMIK, P. C. **Herbicide resistance: a global concern**. Landbouww, p.19-30, 2000.
- BHOWMIK, P. C., INDERJIT. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. **Crop Protection**, v. 22, p. 661-671, 2003.
- BIANCHI, M. A. Programa de difusão do manejo integrado de plantas daninhas em soja. In: **Reunião de pesquisa de soja da região sul**, 23, Porto Alegre, RS. Ata e Resumos, 125p., 1996.
- BÖHM, P. A. F., BÖHM, F. M. L. Z., FERRARESE, M. L. L., SALVADOR, V. H., SOARES, A. R., FERRARESE-FILHO, O. Effects of Juglone on soybean root growth and induction of lignification. **Allelopathy Journal**, v. 25, n. 1, p. 465-474, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRUCK, H., PAY, N. E. W. A., SATTLEMACHER, B. Effects of phosphorus and water supply on yield, transpirational water-use efficiency, and carbon isotope discrimination of pearl millet. **Crop Science**, v. 40, p. 120-125, 2000.

BUBNA, G. A., LIMA, R. B. A., ZANARDO, D. Y. L., DOS SANTOS, W. D., FERRARESE, M. L. L., FERRARESE-FILHO, O. Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*). **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 1627-1633, 2011.

CALVO, C. L., FOLONI, J. S. S., BRANCALIÃO, S. R. Produtividade de fitomassa e relação C/N de monocultivos e consórcios de guandu-anão, milheto e sorgo em três épocas de corte. **Bragantia**, v. 69, n. 1, p.77-86, 2010.

CARDINA, J., SPARROW, D. H., MCCOY, E. L. Analysis of spatial distribution of common lambsquarters (*Chenopodium album*) in no-till soybean (*Glycine max*). **Weed Science**, v. 43, n. 2, p. 258-268, 1995.

CARVALHO, L. B., BIANCO, S., GUZZO, C. D. Interferência de *Euphorbia heterophylla* no crescimento e acúmulo de macronutrientes da soja. **Planta daninha**, v. 28, n. 1, 2010.

CATALDO, D. A., HAROON, M., SCHRADER, L. E., YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.6, p.71-80, 1975.

CERDEIRA, A. L., GAZZIERO, D. L., DUKE, S. O., MATALLO, M. B., SPADOTTO, C. A. Review of potential environmental impacts of transgenic glyphosate-resistant soybean in Brazil. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 42, n. 5, p. 539-549, 2007.

COSTA, J. L. S. Reconstrução do solo e manejo de culturas no controle de doenças radiculares. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. Suplemento, p. 37-38, 2002.

CZARNOTA, M. A., PAUL, R. X., DAYAN, F. E., NIMBAL, C. I., WESTON, L. A. Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: A potent PSII inhibitor in *Sorghum* spp. root exudates. **Weed Technology**, v. 15, p. 813-825, 2001.

DA SILVA, F. P. M., GAVASSON, W. L., BACCHI, L. M. A., GARCEZ, F. R. Germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes resíduos e extratos de plantas cultivadas, **Summa phytopathologica**, vol. 37 n. 3, p. 131-136, 2011.

DARLINGTON, C. D., WYLIE, A. P. Chromosome atlas of flowering plants. - In: MARTIN CIUDAD, A. **Numeros cromosomáticos de plantas vasculares ibéricas I**. – Madrid, 1955.

- DOBLINSKI, P., M. F., FERRARESE, M. L. L., HUBER, D. A., SCAPIM, C. A., BRACCINI, A. L., FERRARESE-FILHO, O. Peroxidase and lipid peroxidation of soybean roots in response to *p*-coumaric and *p*-hydroxybenzoic acids. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 2, p. 193-198, 2003.
- DONG, J., WU, F., ZHANG, G. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). **Chemosphere**, v. 64, p. 1659–1666, 2006.
- dos SANTOS, W. D., FERRARESE, M. L., FERRARESE-FILHO, O. Ferulic Acid: An Allelochemical Troublemaker. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 47-55, 2008a.
- dos SANTOS, W. D., FERRARESE, M. L. L., NAKAMURA, C. V., MOURÃO, K. S. M., MANGOLIN, C. A., FERRARESE-FILHO, O. Soybean (*Glycine max*) Root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 1230-1241, 2008b.
- dos SANTOS, W. D., FERRARESE, M. L. L., FINGER, A., TEIXEIRA, A. C. N., FERRARESE-FILHO, O. Lignification and related enzymes in *Glycine max* root growth-inhibition by ferulic acid. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 6, p. 1203-1212, 2004.
- DUARTE, D. J., BIANCO, S., LEONARDO, B. C., PANOSSO, A. R.. Estimativa da área foliar de *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 527-531, 2009.
- DUKE, S. O., DAYAN, F. E., ROMAGNI, J. G., RIMANDO, A. M. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research**, v. 40, p. 99-111, 2000.
- DUKE, O. S., LYNDON, J. Herbicides from natural compounds. **Weed Technology**, v. 1, p. 122-128, 1987.
- EINHELLIG, F. A. An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. In: INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M.; FOY, C. L. (Ed.). **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton: CRC Press. p. 479-494, 1999.
- EINHELLIG, F. A. Interactions involving allelopathy in cropping systems. **Agronomy Journal**, v. 88, p. 886-893, 1996.
- EINHELLIG, F. A. Mechanisms and mode of action of allelochemicals. In: PUTNAM, A. R., TANG, C. S. (eds.) **The science of allelopathy**. New York: John Wiley & Sons. p. 171-188, 1986.
- EINHELLIG, F. A. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: MACIAS, F. A., CUTLER, H. G., GALINDO, J. C. G., MOLINILLO, J. M. G (eds), **Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, Florida, p. 217-238, 2004.

EINHELLIG, F. A., RASMUSSEN, J. A. Prior cropping with grain sorghum inhibits weeds. **Journal of Chemical Ecology**, v.15, n. 3, p. 951-960, 1989.

FAO: **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Plant production e protection division. <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/biodiversity/weeds/listweeds/eup-het/en/>. acesso em: 11/28/2012 às 14:00h.

FARIA, T. M., GOMES JÚNIOR, F. G., SÁ, M. E., CASSIOLATO, A. M. R. Efeitos alelopáticos de extratos vegetais na germinação, colonização micorrízica e crescimento inicial de milho, soja e feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 6, 2009.

FAY, P. K., DUKE, W. B. An assessment of allelopathic potential in *Avena* germplasm. **Weed Science**, v. 25, p. 224-228, 1977.

FERRARESE, M. L. L., RODRIGUES, J. D., FERRARESE-FILHO, O. Phenylalanine ammonia-lyase activity in soybean roots extract measured by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Plant Biology**, v. 2, p. 152-153, 2000.

FERREIRA, A. G., AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12(Edição Especial), p.175-204, 2000.

FREITAS S. P, RODRIGUES J. C, SILVA C. M. M. Manejo de plantas daninhas no plantio direto da soja (*Glycine max*) sobre o milheto (*Pennisetum maximum*). **Planta Daninha**, v. 24, p. 481-487, 2006.

FRIEDMAN, J., WALLER, G. R. Allelopathy and autotoxicity. **Trends in Biochemical Sciences**, v.10, p. 47-50, 1985.

FUJII, Y., SHIBUYA, T., YASUDA, T. Allelopathy of velvetbean: its discrimination and identification of L-DOPA as a candidate of allelopathic substances. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 25, p. 238-247, 1992.

GAFF, D. F., OKONG 'O-OGOLA, O. The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 22, p. 756-758, 1971.

GATTÁS-HALLAK, A. M., CHAMMA, L., SOUZA, D., SOUZA, I. F. Effects of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) root exudates on the cell cycle of the bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.) root. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 95-99, 1999.

GAZZIERO, D. L. P. MACIEL, C. D. G., SOUZA, R. T., VELINI, E. D., PRETE, C. E. C., OLIVEIRA NETO, W. Deposição de glyphosate aplicado para controle de plantas daninhas em soja transgênica, **Planta Daninha**, v. 24, n. 1, p. 173-181, 2006.

- GLASS, A. D. M. Influence of phenolic acids upon ion uptake. I: Inhibition of phosphate uptake. **Plant Physiology**, v. 51, p. 1037-1041, 1973.
- GONZALEZ, V. M., KAZIMIR, J., NIMBAL, C., WESTON, L. A., CHENIAE, G. M. Inhibition of photosystem II electron transfer reaction by the natural product sorgoleone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p.1415-1421, 1997.
- GUENZI, W. D., MCCALLA, T., NORSTADT, F. A. Presence and persistence of phytotoxic substances in wheat, oat, corn, and sorghum residues. **Agronomy Journal**, v. 59, p. 163-164, 1967.
- GUSMAN, A. B., MUCILLO, G., PIRES, M. H. Efeito do citronelol sobre a germinação e desenvolvimento do amendoim bravo (*Euphorbia heterophylla* L.). **Semina**, v. 11, n. 1, p. 20-24, 1990.
- HACHINOHE, M.; MATSUMOTO, H. Mechanism of selective phytotoxicity of L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (*L*-Dopa) in barnyardgrass and lettuce. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, p. 1919-1926, 2007.
- HAGEMANN, T. R., BENIN, G., LEMES, C., MARCHESE, J. A., MARTIN, T. N., PAGLIOSA, E. S., BECHE, E. Potencial alelopático de extratos aquosos foliares de aveia sobre azevém e amendoim-bravo. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 509-518, 2010.
- HEAP, I. **International survey of herbicide-resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>> Acesso em: 20 de julho de 2012.
- HENSLEY, J. R., COUNSELMAN, C. J. Allelopathic interactions between triazine resistant and susceptible strains of redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus* L.). **Meeting of the Weed Science Society of America**, p. 110, 1979.
- HERRIG, V., FERRARESE, M. L. L., SUZUKI, L. S., RODRIGUES, J. D., FERRARESE-FILHO, O. Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities, phenolic acid contents, and allelochemicals-inhibited root growth of soybean. **Biological Research**, v. 35, p. 59-66, 2002.
- INDERJIT, WARDLE, D. A., KARBAN, R., CALLAWAY, M., R. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. **Ecology and Evolution**, v. 26, n.12, p. 655-662, 2011.
- INDERJIT, DUKE, S.O. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta**, v. 217, p. 529-539, 2003.
- INDERJIT; KEATING, K. I. Allelopathy: Principles, procedures, processes, and promises for biological control. **Advances in Agronomy**, v. 67, p. 141-231, 1999.
- INDERJIT. Plant phenolics in allelopathy. **The Botanical Review**, v. 62, n. 2, p.186-202, 1996.

INOUE, M. H., SANTANA, D. C., VILHENA, K. S. S., SOUZA FILHO, A. P. S., GUILHON, G. M. S. P., POSSAMAI, A. C. S., SILVA, L. E., DALLACORT, R. Avaliação do potencial alelopático de substâncias soladas em sementes de araticum (*Annona crassiflora*). **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 735-741, 2010.

JACOBI, U. S., FLECK, N. G. Avaliação do potencial alelopático de genótipos de aveia no início do ciclo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 11-19, 2000.

JASICKA-MISIAK, I., WIECZOREK, P. P., KAFARSKI, P. Crotonic acid as a bioactive factor in carrot seeds (*Daucus carota* L.). **Phytochemistry**, v.66, n. 12, p.1485-1491, 2005.

JONES, D. H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**, v.23, n.7, p.1349-59, 1984.

KARAM, D. et al. Estudo da interferência das plantas daninhas com a cultura da soja. In: **Congresso brasileiro de plantas daninhas**, Londrina. Resumos... Londrina: SBCPD, p. 32-33. 1993.

KATO-NOGUCHI, H. Stress-induced allelopathic activity and momilactone B in rice. **Journal of Plant Physiology**, v. 59, p. 153–158, 2009.

KISSMANN, K. G., GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: Basf Brasileira, 789 p, 1992.

KOHLI, R. K., BATISH, D., SINGH, H. P. Allelopathy and its implications in agroecosystems. **Journal of Crop Production**, v. 1, p. 169-202, 1998.

KUVA, M. A., PITELLI, R. A., CHRISTOFFOLETI, P. J. ALVES, P. L. C. A. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. I – Tiririca. **Planta Daninha**, v. 18, n. 2, p. 241-251, 2000.

LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. Resistência ao glyphosate em biótipos de *Conyza bonariensis* e *C. canadensis* no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 467-471, 2008.

LAPIERRE, C. Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: JUNG, H. G., BUXTON, D R., HATFIELD, R. D., et al. **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society for Agronomy. p.133-163, 1993.

LEATHER, G. R., Weed control using allelopathic sunflowers and herbicide. **Plant Soil**, v. 98, p. 17–23, 1987.

LÔBO, L. T., CASTRO, K. C. F., ARRUDA, M. S. P., SILVA, M. N., ARRUDA, A. C., MÜLLER, A. H., ARRUDA, G. M. S. P., SANTOS, A. S., SOUZA FILHO, A. P. S. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (leguminosae). **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 493-497, 2008.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. Nova Odessa, 6^o ed., Plantarum, 269 p, 2006.

MACÍAS, F. A., GALINDO, J. L. G., GALINDO, J. C. G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2917-2936, 2007.

MACÍAS, F. A. Allelopathy in the search for natural herbicides models. In: K. M. M. Inderjit and E. F. A. (ed.) **Allelopathy. Organisms, Processes and Applications**. American Chemical Society, p. 310-329, 1995.

MACÍAS, F. A., GALINDO, J. C. G., CASTELLANO, D., VELSACO, R.F. Sesquiterpene lactones with potencial use as natural herbicide models (II) guianolides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5288-5296, 2000.

MAGIERO, E. C.; ASSMANN, J. M.; MARCHESE, J. A. et al. Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 317-324, 2009.

MAIRESSE, L. A. S. E. C. C.; FARIAS, J. R; FIORIN, R. A. Bioatividade de extratos vegetais sobre alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista da FZVA**, v.14, n.2, p. 1-12, 2007.

MARCHIOSI, R. Efeitos do L-DOPA (L-3,4-diidroxifenilalanina) e Extratos de Mucuna e Milheto Sobre o Crescimento e Trocas Gasosas de Plantas de Soja (*Glycine max* L. Merrill). Tese. Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2012.

MATSUMOTO, R. S., RIBEIRO, J. P. N., TAKAO, L. O. K., LIMA, M. I. S. Potencial alelopático do extrato foliar de *Annona glabra* L. (Annonaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 631-635, 2010.

MAUNSBACH, A. B., AFZELIUS, B. A. Dehydration and embedding. In: **Biomedical electron microscopy: Illustrated methods and interpretations**. MAUNSBACH A. B., AFZELIUS B., A., (eds.) San Diego: Academic Press. p. 104-122, 1999.

MESCHEDE, D. K., OLIVEIRA JR., R. S., CONSTANTIN, J., SCAPIM, C. A. Período crítico de interferência de *Euphorbia heterophylla* na cultura da soja, sob baixa densidade de semeadura. **Planta Daninha**, v. 20, n. 3, p. 381-387, 2002.

MORAES, P. V. D., AGOSTINETTO, D., VIGNOLO, G. K., SANTOS, L. S., PANOZZO, L. E. Manejo de plantas de cobertura no controle de plantas daninhas na cultura do milho. **Planta Daninha**, v. 27, n. 2, p. 289-296, 2009.

MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras, Editora da UFLA. 626p , 2002.

MOREIRA, M. S., MELO, M. S. C., CARVALHO, S. J. P., NICOLAI, M., CRHISTOFFOLETI, P. J. Herbicidas alternativos para controle de biótipos de

Conyza bonariensis e *C. canadensis* resistentes ao glyphosate. **Planta daninha**, v. 28, n. 1, p. 167-175, 2010.

NIEMEYER, H. M., PESEL, E., FRANKE, S., FRANCKE, W. Ingestion of the benzoxazinone DIMBOA from wheat plants by aphids. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2307-2310, 1989.

OLIVEIRA JR, R. S., CONSTANTIN, J., INOUE, M. H. Biologia e Manejo de Plantas Daninhas. In: OLIVEIRA JR, R. S. **Mecanismo de ação dos herbicidas**. ed. Omnipax, Curitiba, Paraná, 2012. cap.7, p. 125-139.

OSÓRIO, J., OSÓRIO, M. L., CHAVES, M. M., PEREIRA, J. S. Water deficits are more important in delaying growth than in changing patterns of carbon allocation in *Eucalyptus globules*. **Tree Physiology**, v. 18, p. 363-373, 1998.

PARTELLI, F. L., VIEIRA, H. D., FREITAS, S. P., ESPINDOLA, J. A. A. Aspectos fitossociológicos e manejo de plantas espontâneas utilizando espécies de cobertura em cafeeiro Conilon orgânico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 605-618, 2010.

PENARIOL, M.C.; MONTEIRO, A.C.; PITELLI, R.A.; PEREIRA, G.T. Produção de *Bipolaris euphorbiae* em meios de cultura sólidos e líquidos obtidos de grãos e resíduos agroindustriais. **Bragantia**, v.67, p.805-814, 2008.

PEREIRA FILHO, I. A., FERREIRA, A. S., COELHO, A. M., CASELA, C. R., KARAM, D., RODRIGUES, J. A. S., CRUZ, J. C., WAQUIL, J. M. **Manejo da cultura do milho**. Sete Lagoas, Embrapa. 17p. (Circular Técnica, 29)., 2003.

PEREIRA, M. G., LOSS, A., BEUTLER, S. J., TORRES, J. L. R. Carbono, matéria orgânica leve e fósforo remanescente em diferentes sistemas de manejo do solo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.45, n.5, p.508-514, 2010.

PEREZ, F. J., NUNEZ, J. O. Root exudates of wild oats. Allelopathic effect on spring wheat. **Phytochemistry**, v. 30, n. 7, p. 2199-2202, 1991.

PINTO, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., LOPES, N. P., EPIFANEO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

POPA, V. I., DUMITRU, M., VOLF, I., ANGHEL, N. Lignin and polyphenols as allelochemicals. **Industrial Crops and Products**, v. 27, p.144–149, 2008.

PUTNAM, A. R., DEFRANK, J., BARNES, J. P. Exploitation of allelopathy for weed control in annual and perennial cropping systems. **Journal of Chemical Ecology**, v.9, p.1001-1010, 1983.

RAMIRES, A. C., CONSTANTIN, J., OLIVEIRA JR., R. S., GUERRA, N., ALONSO, D. G., BIFFE, D. F. Controle de *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia* com a utilização de glyphosate isolado ou em associação com latifolicidas, **Planta daninha**, v. 28, n. 3, p. 621-629, 2010.

- REZENDE, A. V., LIMA, J. F., RABELO, C. H. S., RABELO, F. H. S., NOGUEIRA, D. A., CARVALHO, M., FARIA JUNIOR, D. C. N. A., BARBOSA, L. Á. Características morfofisiológicas da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em resposta à adubação fosfatada. **Revista Agrarian**, v.4, n.14, p.335-343, 2011.
- RICE, E. L. **Biological Control of Weeds and Plant Diseases: Advances in Applied Allelopathy**. Oklahoma, University of Oklahoma Press, 1995.
- RICE, E. L. **Allelopathy**. Orlando: Academic, 2. ed. 422 p., 1984.
- RIZVI, S. J. H., RIZVI, V. A. discipline called allelopathy. In: RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. (ed.) **Allelopathy: basic and applied aspects**. London: Chapman & Hall, p. 1-10, 1992.
- RIZZARDI, A. potencial de genótipos de canola (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) na supressão de plantas daninhas. **Universidade de Passo Fundo**. Dissertação. 2007.
- ROUSSEAU, G. X., RIOUX, S., DOSTALER, D. Multivariate effects of plant canopy, soil physico-chemistry and microbiology on Sclerotinia stem rot of soybean in relation to crop rotation and urban compost amendment. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 3325-3342, 2006.
- SAMPIETRO, D. A., VATTUONE, M.A., ISLA, M. I. Plant growth inhibitors isolated from sugarcane (*Saccharum officinarum*) straw. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 837-846, 2006.
- SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M., WEISS, O. A., REIGOSA-ROGER, M. J. Allelopathic evidence in the Poaceae. **Botanical Review**, v. 69, p.300-319, 2004.
- SATHIYAMOORTHY, P. Identification of vanilic acid and *p*-coumaric acid as endogenous inhibitors of soybean seeds and their inhibitory effect on germination. **Journal of Plant Physiology**, v. 136, p. 120-121, 1990.
- SAXENA, A., SINGH, D. V., JOSHI, N. L. Autotoxic effects of pearl millet aqueous extracts on seed germination and seedling growth. **Journal of Arid Environments**, v. 33, n. 2, p. 255-260, 1996.
- SEEFELDT, S. S., JENSEN, S. E., FUERST, E. P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationship. **Weed Technology**, v.9, p. 218-227, 1995.
- SEGONZAC, C., BOYER. J. C., IPOTESI, E., SZPONARSKI, W., TILLARD, P., TOURAINE, B., SOMMERER, N., ROSSIGNOL, M., GIBRATA, R. Nitrate Efflux at the root plasma membrane: identification of an *Arabidopsis* excretion transporter. **The Plant Cell**, v. 19, p. 3760–3777, 2007.
- SEVERINO, F. J., CARVALHO, S. J. P., CHRISTOFFOLETI, P. J. Interferências mútuas entre a cultura do milho, espécies forrageiras e plantas daninhas em um sistema de consórcio: II - implicações sobre as plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 24, n. 1, p. 53-60, 2006.

- SEVERINO, F. J., CHRISTOFFOLETI, P. J. Weed suppression by smother crops and selective herbicides. **Scientia agrícola**, v. 61, n.1, 2004.
- SILVEIRA, M. Preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. São Paulo: USP, v.1, p.71-79, 1989.
- SOUZA FILHO, A. P. S., PEREIRA, A. A. G., BAYMA, J. C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 25-32, 2005.
- SOUZA FILHO, A. P. S., RODRIGUES, L. R. A., RODRIGUES, T. J. D. Potencial alelopático de forrageiras tropicais: efeitos sobre invasoras de pastagens. **Planta Daninha**, v. 15, n. 1, p. 53-60, 1997.
- STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P.M., HARBONE, J. B. (eds.) **Plant Biochemistry**. Academic Press, p.387-416, 1997.
- SZCZEPANSKI, A. J. Allelopathy as a means of biological control of water weeds. **Aquatic Botany**, v. 3, p. 193-197, 1977.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 5.ed. 954p., 2013.
- TOKURA, L. K., NOBREGA, L. H. P. Alelopatia de cultivos de cobertura vegetal sobre plantas infestantes. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, n. 3, p. 379-384, 2006.
- TREZZI, M. M., VIDAL, R. A., KRUSE, N. D. I., NUNES, A. L. Bioensaios para identificação de biótipos de *Euphorbia heterophylla* com resistência múltipla a inibidores da ALS e da PROTOX. **Planta Daninha**, v. 24, n. 3, p. 563-571, 2006.
- TREZZI, M. M., FELIPPI, C. L., MATTEI, D., SILVA, H. L., NUNES, A. L., DEBASTIANI, C., VIDAL, R. A., MARQUES, A. Multiple resistance of acetolactate synthase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors in *Euphorbia heterophylla* biotypes. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 40, n. 1, p. 101-109, 2005.
- TREZZI, M. M., VIDAL, R. A. Potencial de utilização de cobertura vegetal de sorgo e milho na supressão de plantas daninhas em condição de campo: II – Efeitos da cobertura morta. **Planta Daninha**, v. 22, n. 1, p. 1-10, 2004.
- VOLL, E., FRANCHINI, J. C., CRUZ, R. T., GAZZIERO, D. L. P., BRIGHENTI, A. M., ADEGAS, F. S. Chemical interactions of *Brachiaria plantaginea* with *Commelina benghalensis* and *Acanthospermum hispidum* in soybean cropping systems. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 7, p. 1467-1475, 2004.

- VOLL, E., GARCIA, A., GAZZIERO, D. L. P., ADEGAS, F. S. Alelopatia do ácido aconítico em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 4, n. 6, p. 645-648, 2009.
- WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v.39, p. 971-974, 1967.
- WESTON, L.A. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. **Agronomy Journal**, v. 88, p. 860–866, 1996.
- WINK, M., TWARDOWSK, T. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 75, p. 225-233, 1988.
- WU, H., PRATLEY, J., LEMERLE, D., HAIG, T. Evaluation of seedling allelopathy in 453 wheat (*Triticum aestivum*) accessions against annual ryegrass (*Lolium rigidum*) by the equal-compartment-agar method. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 51, p. 937-944, 2000.
- WU, T., WITTKAMPER, J., FLORES, H. E. Root herbivory in vitro: interaction between root and aphids grown in aseptic coculture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 35, p. 259-264, 1999.
- XUAN, T. D., SHINKICHI, T., KHANH, T. D., MIN, C. I. Biological control of weeds and plant pathogens in paddy rice by exploiting plant allelopathy: an overview. **Crop Protection**, v. 24, p.197–206, 2005.
- XUAN, T. D., TSUZUKI, E. Allelopathic plants: buckwheat (*Fagopyrum* spp.). **Allelopathy Journal**, v. 13, p.137-148, 2004.
- XUAN, T. D., TSUZUKI, E., UEMATSU, H., TERAOKA, H. Effects of alfalfa (*Medicago sativa* L.) on weed control in rice. **Allelopathy Journal**, v. 9, p.195–203, 2002.
- YE, S. F., ZHOU, Y. H., SUN, Y., ZOU, L. Y., YU, J. Q. Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots, and promotes incidence of Fusarium wilt. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 255-262, 2006.
- YENISH, J.P., WORSHAM, A.D., CHILTON, W.S. Disappearance of DIBOA-glucoside, DIBOA, and BOA from rye (*Secale cereale* L.) cover crop residue. **Weed Science**, v. 43, p. 18-20, 1995.
- YOUNG, C.C., ZHU THORNE, L. R., WALLER, G. R. Phytotoxic potential of soils and wheat straw in rice rotation cropping systems of subtropical Taiwan. **Plant and Soil**, v. 120, p. 95-101, 1989.
- YU, J. Q., YE, S. F., ZHANG, M. F., HU, W.H. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 2, p. 29-139, 2003.

YU, J. Q., MATSUI, Y. Effects of root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals on ion uptake by cucumber seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, p. 817-827, 1997.

ZANARDO, D. I. L., LIMA, R. B., FERRARESE, M. L. L., BUBNA, G. A., FERRARESE-FILHO, O. Soybean root growth inhibition and lignification induced by *p*-coumaric acid. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, n.1, p. 25–30, 2009.