

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PAULO VINICIUS MOREIRA DA COSTA MENEZES

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, ANATÔMICAS E MORFOLÓGICAS  
CAUSADAS PELA FRAÇÃO BUTANÓLICA DA PALHADA DE *Urochloa ruziziensis*  
(R. Germ. & C.M. Evrard) Crins E DA SAPONINA PROTODIOSCINA SOBRE AS  
PLANTAS DANINHAS *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donell E *Digitaria insularis* (L.)  
Mez ex Ekman**

Maringá

2018

PAULO VINICIUS MOREIRA DA COSTA MENEZES

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, ANATÔMICAS E MORFOLÓGICAS  
CAUSADAS PELA FRAÇÃO BUTANÓLICA DA PALHADA DE *Urochloa ruziziensis*  
(R. Germ. & C.M. Evrard) Crins E DA SAPONINA PROTODIOSCINA SOBRE AS  
PLANTAS DANINHAS *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donell E *Digitaria insularis* (L.)  
Mez ex Ekman**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Emy Luiza Ishii-Iwamoto

Maringá

2018

## **CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO**

**Deverá ser impresso no verso da folha de rosto.**

Para confecção da ficha catalográfica o aluno deverá levar um exemplar impresso da dissertação ou tese à Biblioteca Central da UEM. Para fazer o agendamento e obter informações, acesse o link:

<http://www.sib.uem.br/index.php/servicos/catalogacaopublicacao>

E-mail: [bce-pte@uem.br](mailto:bce-pte@uem.br)

Fone: (44) 3011 - 4387

Paulo Vinicius Moreira da Costa Menezes

**Estudo das alterações bioquímicas, anatômicas e morfológicas causadas pela fração butanólica da palhada de *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Crins e da saponina protodioscina sobre as plantas daninhas *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donell e *Digitaria insularis* (L.) Mez ex Ekman**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração - Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas

Aprovado em: 28/02/2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Emy Luiza Ishii-Iwamoto  
Prof<sup>a</sup>. Orientadora  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira  
Departamento de Biologia Animal e Vegetal  
Centro de Ciências Biológicas da UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lindamir Hernandez Pastorini  
Prof. Componente da Banca  
Universidade Estadual de Maringá

## **BIOGRAFIA**

PAULO VINICIUS MOREIRA DA COSTA MENEZES nasceu em Vilhena-RO, em 20 de janeiro de 1990. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (2015). Em março de 2016 iniciou o Curso de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, na mesma Instituição.

## AGRADECIMENTOS

À Oyagami-Sama (Deus-Parens), que me vivifica e me conduz com seu caloroso amor parental de Pai e Mãe.

À Professora Emy, pelo auxílio e orientação na pós-graduação, e por deixar-nos o exemplo, servindo-nos de modelo a ser seguido não apenas no campo científico e intelectual, mas também no campo pessoal, ético e moral;

Ao Márcio (aka Mito), de quem eu mais aprendi sobre bioquímica durante todos esses anos no Laboratório de Oxidações Biológicas;

À Gislaíne, que conduz o nosso grupo de pesquisa com seu espírito de liderança;

Aos colegas do Laboratório: Ana Luiza, Maurício, Renato, Gabriel, Isabela e Érika pela ajuda, amizade e pela companhia diária;

Aos colegas do Laboratório de Esteatose Hepática Experimental;

Ao Professor Souza, Raísa, Amanda, Luana, Adrielle, Letycia, Leandro, Beatriz e Cida Dantas pelo suporte, ajuda e colaboração;

À Érica Nagasava por ser sempre atenciosa, ao Rodrigo pela amizade e por ser prestativo, à Karina pelas divertidas e acirradas partidas de xadrez no laboratório, e ao Eduardo pela solicitude, e por toda atenção e ajuda recebida;

À Cida Hermoso, a nossa “técnica-coruja”, pela amizade e por todo apoio técnico recebido.

À minha amada esposa Keila Keiko Kadowaki, minha companheira de caminhada nesta jornada;

Ao meu pai Marilton Paulo, minha mãe Nilza, e minha irmã Ana Paula pelo carinho, amor e incentivo;

Ao meu avô Waldyr pelos sábios conselhos;

Aos meus sogros Reiko e Alfredo, e minha cunhada Katy, pela agradável companhia e deliciosas refeições nos finais de semana;

Ao Mestre Rodrigo-Feijão, e aos condutores Rev. Roberto e Alice Tanaka por me ajudarem a manter meu corpo, mente e espírito saudáveis;

Ao corpo docente do PBC pelo suporte teórico, e à Universidade Estadual de Maringá pela estrutura e pela educação pública de qualidade;

E ao CNPq pela bolsa de estudos que me foi concedida.

Eu poderia resumir esta etapa que agora se encerra em uma única palavra: *gratidão*.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

“Both the insignificant and the extraordinary are the architects of the natural world.”

- Carl Sagan

## APRESENTAÇÃO

Em concordância com as normas fixadas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, esta dissertação foi redigida na forma de um artigo a ser submetido ao periódico *Journal of Chemical Ecology*.

Paulo Vinicius Moreira da Costa Menezes, Márcio Shigueaki Mito, Gislaine Cristiane Mantovanelli, Ana Luiza Wagner Zampieri, Beatriz Pereira Moreno, Débora Cristina Baldoqui, Raísa Gonçalves Silva, Amanda Aparecida Oliveira do Carmo, Luíz Antônio de Souza, Rubem Silvério de Oliveira Junior, Emy Luiza Ishii-Iwamoto. Estudo das alterações bioquímicas, anatômicas e morfológicas causadas pela fração butanólica da palhada de *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Crins e da saponina protodioscina sobre as plantas daninhas *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donell e *Digitaria insularis* (L.) Mez ex Ekman



## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO E OBJETIVOS** – O aparecimento de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas convencionais vem aumentando nas últimas décadas, e há um crescente interesse em novas alternativas para o controle dessas plantas. A *Urochloa ruziziensis* é uma forrageira muito utilizada como espécie de cobertura no sistema de plantio direto, e além de trazer vários benefícios para as lavouras e ao solo, ela reduz a emergência de plantas daninhas no campo. Estudos anteriores mostraram que as substâncias extraídas das palhadas de *U. ruziziensis* pelo solvente butanol (fração butanólica – F. But.) inibem o desenvolvimento de algumas plantas daninhas. A saponina esteroideal protodioscina, identificada nesta fração, também exerce toxicidade às plantas daninhas. Nestes estudos, apenas plantas daninhas dicotiledôneas foram avaliadas. Sabe-se, entretanto, que um dos principais fatores que determinam a seletividade dos herbicidas convencionais no controle de plantas daninhas é se pertencem à classe das monocotiledôneas ou das dicotiledôneas, e provavelmente o mesmo fator deve influenciar a seletividade de substâncias naturais. Assim, o presente trabalho foi planejado para comparar a sensibilidade da dicotiledônea *Ipomoea grandifolia* com a da monocotiledônea *Digitaria insularis* às substâncias presentes na F. But. de *U. ruziziensis* e à protodioscina. Os modos de ação das substâncias ativas foram estudados nas duas espécies, avaliando-se parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo energético e ao sistema de defesa antioxidante. A anatomia e a morfologia das raízes de ambas as espécies foram, também, examinadas.

**MATERIAIS E MÉTODOS** – As partes aéreas de *U. ruziziensis* foram coletadas, secas e trituradas. Após extração exaustiva com metanol, as substâncias solúveis foram particionadas pelo uso de diferentes solventes orgânicos, incluindo o butanol. Após a evaporação do solvente, a partir da extração com butanol, foi obtida a F. But. de *U. ruziziensis*. A protodioscina foi adquirida comercialmente. Cinquenta sementes de *I. grandifolia* e *D. insularis* foram semeadas em gerboxes (11 x 11 x 5 cm) contendo 40 mL de ágar 0,8% p/v. A F. But. de *U. ruziziensis* foi dissolvida em meio ágar nas concentrações de 100, 250 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e a protodioscina nas de 50, 100 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Depois da semeadura, as placas foram submetidas à luz UV, envoltas com plástico filme e distribuídas em uma câmara de germinação. Para *I. grandifolia* foi utilizado o fotoperíodo de 12 horas (luz/escuro), na temperatura constante de 30 °C, e para *D. insularis* o fotoperíodo foi de 8 horas na luz, à 30 °C, e 16 horas no escuro, à 20 °C. As sementes germinadas em 24, 48, 72, 96 e 120 horas foram contadas para a determinação do tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e velocidade de germinação acumulada (VGA). Com 120 horas, o comprimento e a massa (fresco e seco) das raízes e partes aéreas das plântulas foram determinados. A atividade respiratória dos ápices das raízes foi avaliada por polarografia; o nível de peroxidação lipídica foi avaliado pela quantificação dos conteúdos de malondialdeído (MDA) e dienos conjugados; a permeabilidade das raízes aos íons foi determinada pela avaliação da condutividade elétrica. Nos extratos das raízes de ambas as espécies, foram avaliadas por métodos espectrofotométricos as atividades das seguintes enzimas: malato desidrogenase (MDH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR). Características anatômicas e morfológicas das raízes foram examinadas através de microscopia óptica e estereoscópica, respectivamente.

**RESULTADOS** – Os principais resultados obtidos neste estudo foram os seguintes:

- 1) Os índices de germinação de *I. grandifolia* não foram significativamente alterados pelo tratamento com F. But. de *U. ruziziensis* ou com a protodioscina. Em contraste, *D. insularis* apresentou uma grande sensibilidade para ambos, em especial para a F. But. de *U. ruziziensis*.
- 2) O desenvolvimento inicial das plântulas de ambas as espécies foram sensíveis à F. But. de *U. ruziziensis* e à protodioscina. Todos os parâmetros biométricos do desenvolvimento das plântulas foram reduzidos e a protodioscina foi, em geral, mais ativa que a F. But. de *U. ruziziensis*. O  $\text{IC}_{50}$  para o crescimento das raízes na *I. grandifolia* foi de 230  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para a F. But., e 54  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para a protodioscina. Para *D. insularis*, os valores correspondentes foram

108  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para F. But., e 34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para protodioscina.

3) Quando as plântulas de ambas as espécies cresceram na presença de F. But. de *U. ruziziensis* e protodioscina, nas concentrações equivalentes aos  $\text{IC}_{50}$  para o crescimento das raízes, verificou-se que a atividade respiratória dos ápices radiculares de *I. grandifolia* foi mais afetada que a de *D. insularis*, sendo a F. But. de *U. ruziziensis* mais ativa que a protodioscina. A F. But. de *U. ruziziensis* aumentou a respiração total, a respiração KCN-sensível e a respiração KCN-insensível em *I. grandifolia*, e a protodioscina exerceu apenas uma estimulação na respiração KCN-insensível. O único efeito observado em *D. insularis* foi uma inibição da respiração KCN-sensível pela F. But. de *U. ruziziensis*.

4) A atividade da malato desidrogenase nos extratos das raízes de *D. insularis* foi maior do que a de *I. grandifolia* nas plântulas-controle, e o tratamento com F. But. de *U. ruziziensis* e protodioscina inibiu a atividade enzimática apenas em *D. insularis*.

5) Comparações das atividades das enzimas antioxidantes nas plântulas-controle revelaram que as atividades da SOD, CAT e APX foram maiores em *D. insularis* que em *I. grandifolia*. As atividades da GR e da POD foram similares em ambas as espécies. O tratamento de ambas as espécies de plantas daninhas com F. But. de *U. ruziziensis* ou protodioscina exerceu efeitos diferenciais nas enzimas. Enquanto que em *I. grandifolia*, a F. But. de *U. ruziziensis* estimulou as atividades da SOD e da POD e inibiu as atividades da CAT e da GR, em *D. insularis* não ocorreram mudanças na atividade da SOD, a atividade da CAT foi estimulada e a da POD foi inibida. As atividades da GR e da APX não foram modificadas. A protodioscina também exerceu um efeito distinto em ambas as espécies. Em *I. grandifolia*, as atividades da SOD e da POD foram estimuladas e a atividade da CAT foi inibida. Em *D. insularis*, a protodioscina não alterou as atividades da SOD, GR e da APX, mas estimulou a atividade da CAT e inibiu a atividade da POD.

6) A F. But. de *U. ruziziensis* e a protodioscina exerceram mudanças similares nos conteúdos de MDA e de dienos conjugados das raízes de *I. grandifolia*: o conteúdo de MDA foi reduzido, mas o conteúdo de dienos conjugados foi aumentado. Em *D. insularis*, a protodioscina foi inativa, e a F. But. de *U. ruziziensis* aumentou o conteúdo de dienos conjugados.

7) A condutividade das raízes a íons foi aumentada pelos tratamentos com a F. But. de *U. ruziziensis* ou com a protodioscina tanto na *I. grandifolia* quanto na *D. insularis*.

8) As análises da anatomia e da morfologia das plantas daninhas revelaram que o tratamento de *I. grandifolia* com ambas, F. But. de *U. ruziziensis* e protodioscina exerceu um notável encurtamento das raízes, induziu o aparecimento de raízes laterais próximas ao ápice, e provocou um escurecimento das raízes. No córtex das raízes das plântulas de *I. grandifolia* tratadas com a F. But. de *U. ruziziensis*, foram observadas cavidades semelhantes aos aerênquimas, que foram mais numerosos que aqueles das raízes-controle, mas menos extensos que os visualizados no tratamento com protodioscina. Ambos os tratamentos induziram o desenvolvimento dos câmbios de origem procambiais, os quais não foram observados nas raízes-controle, além do aumento de tecidos vasculares. Em *D. insularis*, ambos os tratamentos causaram encurtamento da raiz adventícia. Nos tratamentos com F. But. de *U. ruziziensis*, a exoderme apresentou células com espessamento parietal em forma de U, e as células endodérmicas apresentaram-se comprimidas e com lumem reduzido. No tratamento com a protodioscina, a *D. insularis* apresentou a camada subepidérmica (exoderme) com células providas de espessamento em forma de U, similares aos das células da endoderme.

**DISCUSSÃO** – Os resultados deste trabalho revelaram diferentes respostas da planta daninha dicotiledônea *I. grandifolia* e da monocotiledônea *D. insularis* ao tratamento com a F. But. de *U. ruziziensis* e à protodioscina. Enquanto que a germinação da *I. grandifolia* foi pouco afetada por ambos os tratamentos, a germinação de *D. insularis* foi inibida, especialmente pela F. But. de *U. ruziziensis*. O desenvolvimento das plântulas das duas espécies de plantas daninhas foi, entretanto, alterado por ambos os tratamentos, com efeitos mais pronunciados da protodioscina. A avaliação da atividade respiratória de ápices radiculares indicou que uma interferência na produção mitocondrial de ATP não foi o principal modo de ação pelos quais os compostos ativos de F. But. de *U. ruziziensis* ou a protodioscina inibiram o desenvolvimento das plântulas das duas plantas daninhas. Por outro lado, as observações de que tanto a F. But. de *U.*

*ruzizensis* como a protodioscina causaram estímulo da respiração KCN-insensível, alteração da atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante e aumento dos conteúdos de dienos conjugados, foram fortes evidências de que ambos os tratamentos induziram um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Em geral, a extensão destas mudanças em *D. insularis* foi menos pronunciada se comparada com as encontradas em *I. grandifolia*, e a protodioscina foi menos ativa que a F. But. de *U. ruzizensis*. A hipótese mais provável para explicar as mudanças morfo-anatômicas observadas nas duas plantas daninhas, particularmente na *I. grandifolia*, é a de que os compostos ativos da F. But. de *U. ruzizensis*, assim como a protodioscina, induziram um distúrbio na homeostase dos hormônios que regulam o desenvolvimento das plântulas. Um envolvimento das auxinas foi indicado pela redução do alongamento da raiz primária e aparecimento de raízes laterais em *I. grandifolia*. O etileno, por sua vez, estaria envolvido na formação de aerênquimas no córtex das raízes de *I. grandifolia*.

**CONCLUSÃO** – O conjunto dos resultados nos permite sugerir que as alterações induzidas pela F. But. de *U. ruzizensis* e também pela protodioscina nas plantas daninhas *I. grandifolia* e *D. insularis* foram respostas celulares adaptativas orquestradas por hormônios, provavelmente auxinas e etileno, tendo os EROs como sinalizadores moleculares e também como indutores de danos oxidativos. Em geral, a planta daninha monocotiledônea *D. insularis* exibiu menor sensibilidade que a dicotiledônea *I. grandifolia*. A protodioscina parece ser um dos componentes ativos da F. But. de *U. ruzizensis*, visto que exerceu efeitos, em geral, muito similares aos exercidos pela F. But. de *U. ruzizensis* em ambas as espécies de plantas daninhas analisadas.

## GENERAL ABSTRACT

**INTRODUCTION AND OBJECTIVES** – The emergence of weed biotypes resistant to conventional herbicides has been increasing in recent decades, and there is a growing interest in new alternatives for control of these plants. *Urochloa ruziziensis* is a forage widely used as a cover plant in a non-till system, and besides several benefits to crops and soil, it reduces the emergence of weeds in the field. Previous studies have shown that the compounds extracted from *U. ruziziensis* straw, by the butanol solvent (butanolic fraction - F. But.), inhibit the development of some weeds. A steroidal saponin protodioscin, identified in this fraction, also exerts toxicity against weeds. In these studies only dicotyledon weeds were assayed. It is known, however, that the one of the main factors that promotes the selectivity of conventional herbicides to weed control is if they belong to monocotyledon or dicotyledon classes. Probable, the same factor should influence the selectivity of natural compounds. Thus, the present work was performed to compare the sensitivity of the dicotyledon *Ipomoea grandifolia* with that of the monocotyledon *Digitaria insularis* to the F. But. of *U. ruziziensis* and to protodioscin. Their modes of action were also studied in the two species, by measuring biochemical parameters related to energy metabolism and to the antioxidant defense system. The anatomy and the morphology of the roots of both species were also examined

**MATERIALS AND METHODS** – The aerial parts of *U. ruziziensis* was collected, dried and crushed. After exhaustive extraction with methanol, the soluble compounds were partitioned by using different organic solvents, including butanol. From butanolic extract it was obtained, after solvent evaporation, the F. But. of *U. ruziziensis*. Protodioscin was commercially acquired. Fifty seeds of *I. grandifolia* and *D. Insularis* were seeded in gerboxes (11 x 11 x 5 cm) containing 40 mL of 0.8% agar w/v. The F. But. of *U. ruziziensis* was dissolved in the agar medium at concentrations of 100, 250 and 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and protodioscin at concentrations of 50, 100 and 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . After sowing, the plates were submitted to UV light, closed with plastic film, and distributed in a germination chamber. For *I. grandifolia*, the 12 hours photoperiod (light/dark) and constant temperature of 30 °C were used, and for *D. insularis* the photoperiod was 8 hours light at 30 °C, and 16 hours dark at 20 °C. The seeds germinated at 24, 48, 72, 96 and 120 hours were counted for determination of the mean germination time ( $\bar{t}$ ), the speed of germination (S) and the speed of accumulated germination (AS). At 120 hours, the lengths and the weights (dry and fresh) of the root and aerial parts of seedlings were determined. The respiratory activity of the root apex was measured by polarography; the level of lipid peroxidation was quantified by the measurement of the content of malondialdehyde (MDA) and conjugated dienes; the permeability of roots to ions was determined by electrical conductivity measurement. In the extracts of the roots of both species the activity of following enzymes was evaluated by spectrophotometric methods: malate dehydrogenase (MDH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR). Anatomic and morphological characteristics of the roots were examined through optical and stereoscopic microscopy, respectively.

**RESULTS** - The main results obtained in this study were the following:

- 1) The germination indexes of *I. grandifolia* were not significantly altered by treatments with F. But. of *U. ruziziensis* or protodioscin. In contrast, *D. insularis* presented a high sensitivity to both, particularly to F. But. of *U. ruziziensis*.
- 2) The initial development of the seedlings of both species was sensitive to F. But. of *U. ruziziensis* and to protodioscin. All biometric parameters of seedling development were reduced and protodioscin was in general more active than the F. But. of *U. ruziziensis*. The  $\text{IC}_{50}$  for root growth in the *I. grandifolia* was 230  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for F. But., and 54  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for protodioscin. For *D. insularis*, the corresponding values were 108  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for F. But., and 34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for protodioscin.
- 3) When the seedlings of both species were grown in the presence of the F. But. of *U. ruziziensis* or protodioscin, at the concentrations equivalent to  $\text{IC}_{50}$  for root growth inhibition, it

was found that the respiratory activity of root apices from *I. grandifolia* was much more affected than that of *D. insularis*, being the F. But. of *U. ruziziensis* more active than protodioscin. The F. But. of *U. ruziziensis* increased the total respiration, the KCN-sensitive respiration and the KCN-insensitive respiration in *I. grandifolia*, and protodioscin exerted only a stimulation in the KCN-insensitive respiration. The only effect observed in *D. insularis* was an inhibition of KCN-sensitive respiration by F. But. of *U. ruziziensis*.

4) Malate dehydrogenase activity in the root extracts of *D. insularis* was higher than that of *I. grandifolia* in the control seedlings, and the treatment with F. But. of *U. ruziziensis* or protodioscin inhibited the enzyme activity only in *D. insularis*.

5) Comparison of the activity of the antioxidant enzymes in the control seedlings revealed that the activities of SOD, CAT and APX were higher in *D. insularis* than in *I. grandifolia*. The GR and POD activities were similar in both species. Treatments of both weed species with F. But. of *U. ruziziensis* or protodioscin exerted differential effects on the enzymes. Whereas in *I. grandifolia*, F. But. of *U. ruziziensis* stimulated SOD and POD activity and inhibited CAT and GR activity, in *D. insularis* there was no change in SOD activity, the activity of CAT was stimulated, POD activity was inhibited, and the activities of GR and APX were not modified. Protodioscin also exerted distinct effects on both species. In *I. grandifolia*, the activity of SOD and POD was stimulated and CAT activity was inhibited. In *D. insularis*, protodioscin did not alter the activities of SOD, GR and APX, but it stimulated CAT and inhibited POD activity.

6) The F. But. of *U. ruziziensis* and protodioscin exerted similar changes in the contents of MDA and conjugated dienes in the *I. grandifolia* roots: the MDA content was reduced, but the content of conjugated dienes was increased. In *D. insularis*, protodioscin was inactive and the F. But. of *U. ruziziensis* increased the content of conjugated dienes.

7) The conductivity of the roots to ions was increased by treatment with the F. But. of *U. ruziziensis* or protodioscin in both *I. grandifolia* and *D. insularis*

8) The analysis of the anatomy and morphology of weed roots revealed that the treatment of *I. grandifolia* with both F. But. of *U. ruziziensis* and protodioscin exerted a remarkable shortening of the primary roots, induced the presence of lateral roots near the root apex and caused a brownish of the roots. In the root cortex of *I. grandifolia* treated with F. But. of *U. ruziziensis* it was observed cavities which resemble aerenchymas which were more numerous than those of the control roots, but smaller when compared to the roots treated with protodioscin. Both treatments induced the development of cambium of procambial origin, which was not observed in the control root, in addition to increase of the conduction tissues. In *D. insularis*, both treatments caused shortening of the adventitious root. In the treatment with F. But. of *U. ruziziensis*, the exodermis presented cells with parietal thickening U shaped, and the endodermal cells were compressed and with reduced lumen. Under treatment with protodioscin, *D. insularis* showed the subepidermal layer (exodermis) with cells provided with U-shaped thickening, similar to the cells of the endodermis.

**DISCUSSION** - The results of this work revealed differences in the responses of the dicotyledon weed *I. grandifolia* and of the monocotyledon *D. insularis* to treatment with the F. But. of *U. ruziziensis* and also to protodioscin. Whereas the germination of *I. grandifolia* was slightly affected by both treatments, the germination of *D. insularis* was inhibited, especially by F. But. of *U. ruziziensis*. The development of the seedlings of the two weeds was, however, altered by both treatments, with more pronounced effects of the protodioscin. The measurements of the respiratory activity of root apices indicated that an interference in the mitochondrial production of ATP was not the main mode of action by which the active compounds of F. But. of *U. ruziziensis* or protodioscin inhibited the seedling development of both weeds. On the other hand, the observations that both F. But. of *U. ruziziensis* and protodioscin stimulated the KCN-insensitive respiration, altered the activities of enzymes of the antioxidant defense system, and increased the content of conjugated dienes, were strong indicators that both treatments led to an increased generation of oxygen reactive species (ROS). In general, the extent of these changes in *D. insularis* was less pronounced than those in *I. grandifolia*, and protodioscin was less active than the F. But. of *U. ruziziensis*. The most likely hypothesis to explain the morpho-anatomic changes observed in both weeds, particularly in *I.*

*grandifolia*, is that the active compounds of F. But. of *U. ruziziensis* as well as protodioscin induced a disturbance in the homeostasis of the hormones that regulate the seedling development. An involvement of auxins was indicated by the reduction of the primary root elongation and the appearance of lateral roots in *I. grandifolia*. Ethylene, in turn, would be involved in the formation of aerenchyma in the root cortex of *I. grandifolia*.

**CONCLUSION** - The whole of the results allows to suggest that the alterations induced by the F. But. of *U. ruziziensis* and also by protodioscin in the weeds *I. grandifolia* and *D. insularis* were cellular adaptive responses orchestrated by hormones, probably auxins and ethylene, having the EROs as signaling molecules and also as agents of oxidative damage. In general, the monocotyledon weed *D. insularis* exhibited lower sensitivity than the dicotyledon *I. grandifolia*. Protodioscin seems to be one of the active components of the F. But. of *U. ruziziensis* since it exerted, in general, similar alterations as those caused by the F. But. of *U. ruziziensis* in both weed species assayed.

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, ANATÔMICAS E MORFOLÓGICAS CAUSADAS  
PELA FRAÇÃO BUTANÓLICA DA PALHADA DE *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard)  
Crins E DA SAPONINA PROTODIOSCINA SOBRE AS PLANTAS DANINHAS *Ipomoea grandifolia*  
(Dammer) O'Donnell E *Digitaria insularis* (L.) Mez ex Ekman

PAULO VINICIUS MOREIRA DA COSTA MENEZES<sup>1</sup>, MÁRCIO SHIGUEAKI MITO<sup>1</sup>, GISLAINE  
CRISTIANE MANTOVANELLI<sup>1</sup>, ANA LUIZA WAGNER ZAMPIERI<sup>1</sup>, BEATRIZ PEREIRA  
MORENO<sup>2</sup>, DÉBORA CRISTINA BALDOQUI<sup>2</sup>, RAÍSA GONÇALES SILVA<sup>3</sup>, AMANDA  
APARECIDA OLIVEIRA DO CARMO<sup>3</sup>, LUÍZ ANTÔNIO DE SOUZA<sup>3</sup>, RUBEM SILVÉRIO DE  
OLIVEIRA JUNIOR<sup>4</sup>, EMY LUIZA ISHII-IWAMOTO<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Oxidações Biológicas, Departamento de Bioquímica, <sup>2</sup>Grupo de Síntese e Produtos  
Naturais, Departamento de Química, <sup>3</sup>Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Biologia,  
<sup>4</sup>Núcleo Avançado de Plantas Daninhas, Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de  
Maringá, 87020900 Maringá, Brasil.

\*Autor correspondente

Filiação: Laboratório de Oxidações Biológicas

Departamento de Bioquímica,

Universidade Estadual de Maringá, 87020900 Maringá, Brasil.

E-mail: [eliwamoto@uem.br](mailto:eliwamoto@uem.br)

Fax: 55-44-32614896

**Resumo** - Os biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas convencionais vêm aumentando nas últimas décadas, levando a um interesse crescente em novas alternativas para o controle das mesmas. As substâncias presentes na fração butanólica (F. But.) de *Urochloa ruziziensis*, incluindo a protodioscina, apresentam a habilidade de inibir as plantas daninhas. Estas substâncias podem apresentar seletividade de ação entre plantas daninhas das classes de dicotiledôneas e monocotiledôneas. Para examinar esta possibilidade, este trabalho comparou a sensibilidade da dicotiledônea *Ipomoea grandifolia* e da monocotiledônea *Digitaria insularis* às essas substâncias. Os parâmetros de germinação e crescimento inicial de ambas as plantas daninhas tratadas com a F. But. de *U. ruziziensis* (50-500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ou com a protodioscina (50-250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram avaliados. Em ambas as espécies tratadas com a  $\text{IC}_{50}$  para a inibição das raízes, foram avaliadas a atividade respiratória do ápice da raiz, o sistema enzimático de defesa antioxidante, os indicadores de estresse oxidativo, e a anatomia e a morfologia das raízes. A germinação de *D. insularis* foi muito mais alterada pela F. But. de *U. ruziziensis* ou pela protodioscina quando comparada com a germinação de *I. grandifolia*. Ambos os tratamentos inibiram o desenvolvimento das duas plantas daninhas, com efeitos mais pronunciados da protodioscina. A medida da atividade respiratória dos ápices das raízes indicou que uma interferência na produção mitocondrial de ATP não foi o principal modo de ação da F. But. de *U. ruziziensis* ou da protodioscina. Ambos os tratamentos estimularam a respiração KCN-insensível, alteraram as atividades das enzimas do sistema de defesa antioxidante, e aumentaram os conteúdos de dienos conjugados, indicando que tanto a F. But. de *U. ruziziensis* como a protodioscina induziram uma condição de estresse oxidativo nas duas plantas daninhas. As alterações morfo-anatômicas encontradas nas plantas daninhas sugeriram que a F. But. de *U. ruziziensis* e a protodioscina induziram um distúrbio na homeostase dos hormônios que regulam o desenvolvimento das plântulas, possivelmente envolvendo auxinas e etileno, particularmente na *I. grandifolia*. A extensão das alterações foi menos pronunciada em *D. insularis* do que em *I. grandifolia*, e a protodioscina foi menos ativa que a F. But. de *U. ruziziensis*. A protodioscina parece ser um dos principais componentes ativos da F. But. de *U. ruziziensis* pois, em geral, a protodioscina exerceu alterações similares àquelas causadas pela F. But. de *U. ruziziensis* nas duas plantas daninhas estudadas.

Palavras-chave: EROs, alelopatia, estresse oxidativo.



**Abstract** – Weed biotypes resistant to conventional herbicides have been increasing in recent decades, leading to a growing interest in new alternatives for their control. The compounds present in the butanolic fraction (F. But.) of *Urochloa ruziziensis*, including protodioscin, have the ability to inhibit weed. These compounds may present selectivity of action among the dicotyledonous and monocotyledonous classes of weeds. To examine this possibility, this work has compared the sensitivity of the dicotyledon *Ipomoea grandifolia* and the monocotyledon *Digitaria insularis* to these substances. The parameter of germination and initial growth of both weed species treated with F. But. of *U. ruziziensis* (50-500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) or protodioscin (50-250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were measured. In both species treated with  $\text{IC}_{50}$  for inhibition of root length, the respiratory activity of root apex, the antioxidant defense enzyme system, oxidative stress indicators, and the anatomy and root morphology of roots were evaluated. The germination of *D. insularis* was much more altered by F. But. of *U. ruziziensis* or protodioscin when compared with *I. grandifolia* germination. Both treatments inhibited the development of the two weeds, with more pronounced effects of the protodioscin. The measurements of the respiratory activity of root apices indicated that an interference in the mitochondrial production of ATP was not the main mode of action of the F. But. of *U. ruziziensis* or protodioscin. Both treatments stimulated the KCN-insensitive respiration, altered the activities of enzymes of the antioxidant defense system, and increased the content of conjugated dienes, indicating that they induce a condition of oxidative stress in the two weeds. The morpho-anatomic changes found in the weeds suggested that the F. But. of *U. ruziziensis* and protodioscin induced a disturbance in the homeostasis of the hormones that regulate the seedling development, possibly involving auxins and ethylene, particularly in *I. grandifolia*. The extent of the changes was less pronounced in *D. insularis* than in *I. grandifolia*, and protodioscin was less active than the F. But. of *U. ruziziensis*. Protodioscin seems to be one of the main active components of the F. But. of *U. ruziziensis* since it exerted, in general, similar alterations as those caused by the F. But. of *U. ruziziensis* in both weeds assayed.

**Keywords:** ROS, allelopathy, oxidative stress.

## INTRODUÇÃO

O controle de plantas daninhas no campo é feito principalmente pela utilização de herbicidas sintéticos. O glifosato tem sido o herbicida mais utilizado, controlando um amplo espectro de plantas daninhas anuais e perenes (Powles e Yu 2010). No entanto, o número de biótipos de plantas daninhas resistentes a este herbicida vem crescendo desde os primeiros relatos em 1996 (Christoffoleti e López-Ovejero 2003). A ocorrência de plantas daninhas resistentes a outras classes de herbicidas, como as triazinas, inibidores da acetil-CoA carboxilase (ACCase) e inibidores da acetolactato sintase (ALS) tem sido relatada desde a década de 70 (Kissmann 1996; Heap 2014).

Devido a este aumento de biótipos resistentes há um crescente interesse em novas abordagens para o controle das plantas daninhas, que reduzam a dependência dos atuais herbicidas sintéticos, promovam a agricultura sustentável e que sejam menos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana e animal. O sistema de plantio direto utilizando determinadas culturas de cobertura tem sido considerado uma dessas alternativas (Teasdale e Mohler 2000; Bond e Midgley 2003). Além de efeitos físicos benéficos e da incorporação de nutrientes no solo, as culturas de cobertura podem também suprimir a germinação e o crescimento de plantas daninhas por ação das substâncias químicas (aleloquímicos) liberadas das palhadas (Oliveira Jr et al. 2014). Ao atuar por mecanismos de ação diferentes dos herbicidas sintéticos, os aleloquímicos podem auxiliar no controle de biótipos de plantas daninhas resistentes (Duke 1986; Weston 1996; Schulz et al. 2013).

Os aleloquímicos podem reduzir a emergência das plantas daninhas por inúmeros mecanismos, geralmente inibindo uma enzima ou uma via metabólica essencial para a germinação e o desenvolvimento inicial da plântula. Dentre esses processos essenciais, destaca-se a produção de ATP. Na fase logo após a embebição das sementes, as células dos tecidos embrionários, das radículas e dos hipocótilos são heterotróficos (Bewley et al. 2013). Nesta condição, o embrião e as plântulas dependem das reservas existentes na semente para a obtenção de energia para a síntese de macromoléculas, divisão celular e diferenciação. A fermentação e depois o metabolismo mitocondrial fornecem o ATP necessário nestas fases até que os eófilos se desenvolvam e a fotossíntese passa a fixar carbono, formando fotoassimilados, o ATP e o potencial redutor do NADPH para as plantas (Nicholls e Ferguson 2013). Outro processo importante durante a germinação e o crescimento inicial é o sistema de defesa antioxidante, que protege as células de danos oxidativos induzidos pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas em situações de estresses bióticos ou abióticos (Sharma et al. 2010). Embora atuem como moléculas sinalizadoras em uma variedade de processos celulares, quando em excesso elas danificam as estruturas de membrana, proteínas e ácidos nucleicos (Sharma et al. 2012; Buchanan et al. 2015; Pergo et al. 2017). A eliminação do excesso das EROs é realizada por um eficiente sistema de defesa envolvendo antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (Noctor e Foyer 1998; Buchanan et al. 2015). Assim, substâncias químicas liberadas das palhadas que inibam o metabolismo energético ou perturbem o sistema de defesa antioxidante nas primeiras fases de desenvolvimento das plantas daninhas são potenciais agentes herbicidas (Ishii-Iwamoto et al. 2006; Pergo e Ishii-Iwamoto 2011).

A *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & Evrard) Crins tem sido muito utilizada como espécie de cobertura devido à alta produção de matéria seca em um curto período de tempo e à sua adaptação a

vários tipos de climas e solos, preferencialmente com boa drenagem, tolerando fertilidade média. Essa espécie apresenta boa proteção contra a erosão, além de boa habilidade para competir com plantas daninhas (Hirata et al. 2009). Um estudo fitoquímico realizado com a palhada da parte aérea da *U. ruziziensis* revelou que as substâncias extraídas pelo solvente butanol (fração butanólica – F. But.) foram as que exerceram maior toxicidade sobre algumas espécies de plantas daninhas, como por exemplo o amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) e o picão-preto (*Bidens pilosa*). Análises de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bi-dimensionais realizadas por Silva (2014) revelaram nesta fração a presença das saponinas protodioscina, protoneodioscina, metilprotoneodioscina e metilprotodioscina (Fig. 1).

As saponinas são metabólitos secundários amplamente distribuídos em plantas superiores (Sparg et al. 2004; Podolak et al. 2010). Elas são substâncias de elevada massa molecular e complexa estrutura química, apresentando variabilidade em suas estruturas agliconas (triterpeno ou esteróide), na natureza da(s) cadeia(s) glicosídica(s) laterais e na posição em que elas estão ligadas à estrutura aglicona (Francis et al. 2002; Siedentopp 2008). A protodioscina e a protoneodioscina pertencem à classe das saponinas esteroidais (Xu et al. 2007). Em um estudo anterior (Mito, 2014), foi observado que a F. But. de *U. ruziziensis* e também a protodioscina inibem o desenvolvimento da *B. pilosa*, afetando vários processos bioquímicos. A protodioscina atua sobre a respiração da raiz primária, inibe a atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase, e promove uma condição de estresse oxidativo. Foram visualizadas adicionalmente alterações na morfologia das plântulas, mas que não foram estudadas de forma sistemática.

É conhecido que as plantas daninhas apresentam diferentes sensibilidades aos herbicidas sintéticos e, muito possivelmente, o mesmo deve ocorrer com as substâncias naturais com potencial herbicida (Christoffoleti e López-Ovejero 2003). Um dos principais fatores que diferenciam as plantas suscetíveis das resistentes são as diferenças fisiológicas e estruturais entre espécies dicotiledôneas e monocotiledôneas. Estas apresentam várias diferenças na estrutura e organização das sementes, no número de cotilédones, na organização e disposição dos feixes vasculares e no formato das raízes (Cutler et al. 2009; Taiz e Zeiger 2010; Buchanan et al. 2015). Plantas monocotiledôneas não possuem faixas procambiais adjacentes ao floema no sistema vascular e, em geral, não estão sujeitas ao crescimento desordenado desse tecido meristemático causado por determinados herbicidas (Tomkins e Grant 1978).

A *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donell (corda-de-viola) é uma espécie de planta daninha dicotiledônea altamente prejudicial em culturas anuais de verão nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, sendo encontrada também na Argentina, Uruguai e no Paraguai (Holm et al. 1997; Rizzardi et al. 2004). As sementes de *I. grandifolia* mantêm-se viáveis durante anos no solo sem germinar devido, em parte, à impermeabilidade de seus tegumentos (Azania et al. 2003). Dentre as espécies de plantas daninhas monocotiledôneas destaca-se a *Digitaria insularis* (L.) Mez ex Ekman (capim-amargoso). Esta é uma espécie nativa de regiões tropicais e subtropicais da América, onde é frequentemente encontrada em pastagens, cafezais, pomares e em áreas ruderais como beira de estradas e terrenos baldios (Machado et al. 2008). Ela tem capacidade de formação de rizomas, que apesar de curtos são bem evidentes, formando notáveis touceiras (Clayton et al. 2006). Além disso, esta espécie tem capacidade de disseminação por sementes durante praticamente todo o verão (Kissman e Groth 1997; Lorenzi 2000).

Nos estudos anteriores, os efeitos da F. But. de *U. ruziziensis* e da protodioscina foram avaliados somente em espécies de plantas daninhas dicotiledôneas. Assim, o presente trabalho foi planejado para

comparar a sensibilidade da *I. grandifolia*, uma espécie dicotiledônea, com a *D. insularis*, uma espécie monocotiledônea, às substâncias químicas da F. But. de *U. ruziziensis* e também à protodioscina. Para analisar os modos de ação das substâncias ativas foram avaliados parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo energético das plântulas, entre eles a atividade respiratória de ápices radiculares, a atividade da enzima malato desidrogenase e a permeabilidade das raízes primárias aos íons. Parâmetros indicadores do sistema de defesa antioxidante também foram avaliados, bem como a anatomia e a morfologia das raízes de ambas as espécies por meio de microscopia óptica e estereoscópica.

## MATERIAIS E MÉTODOS

*Obtenção da fração butanólica de U. ruziziensis (R. Germ. & C.M. Evrard) Crins, da protodioscina e das sementes de I. grandifolia (Dammer) O'Donell e D. insularis (L.) Mez ex Ekman*

O material vegetal de *U. ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Crins foi cultivado em campo aberto na Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá, distrito de Iguatemi, Estado do Paraná, Brasil (23° 20' 58, 86" S e 52° 04' 27, 56" O). As principais propriedades físico-químicas do solo foram pH 6,9; 86% areia; 3% silte, 11% argila e 6,08 g dm<sup>-3</sup> de carbono orgânico. O plantio foi realizado com semeadeira. As partes aéreas da planta foram coletadas no estágio de pré-florescimento. Em seguida foram secas em estufa de secagem com ventilação forçada à temperatura ambiente, e trituradas para as etapas de extração. Inicialmente o material foi extraído com hexano a frio para retirada das ceras. Em seguida o resíduo foi extraído com metanol 95% a frio, por maceração exaustiva. Após remoção do solvente sob vácuo em evaporador rotatório, à temperatura de 33-35 °C, obteve-se o extrato bruto metanólico. Este extrato foi dissolvido em cerca de 1,0 L de metanol:água na proporção de 1:1 e submetido a extrações sequenciais com os seguintes solventes orgânicos: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Em cada etapa de extração, os resíduos resultantes foram extraídos 3 vezes com 150 mL de cada solvente. As frações obtidas após evaporação de cada um dos solventes, utilizando um evaporador rotativo, resultaram nas frações hexano (Hex.), diclorometano (F. D. M.), fração acetato de etila (F. A. E.) e fração butanólica (F. But.). Neste trabalho foi utilizada apenas a fração butanólica (F. But.). A protodioscina (98% HPLC) foi comprada da Aktin Chemicals Inc. (Republica da China), e as sementes de *I. grandifolia* (Dammer) O'Donell e *D. insularis* (L.) Mez ex Ekman foram adquiridas da empresa Cosmos Agrícola Produtos e Serviços Rurais LTDA-Brasil.

### *Germinação e crescimento inicial das plantas daninhas*

As sementes de *I. grandifolia* e de *D. insularis* foram previamente selecionadas quanto ao tamanho e aparência. As sementes de *I. grandifolia* foram submetidas à quebra de dormência com ácido sulfúrico por 45 minutos, seguida de lavagem com água destilada. As sementes de *D. insularis* foram lavadas com água destilada. Posteriormente, as sementes de ambas as espécies foram levadas a uma capela de fluxo laminar para a semeadura em gerbox (11 x 11 x 5 cm), previamente higienizadas com álcool etílico 70%, e contendo 40 mL de meio de cultivo ágar na concentração de 0,8% (p/v), previamente esterilizado em autoclave. Foram distribuídas 50 sementes em cada gerbox. A F. But. de *U. ruziziensis* ou a protodioscina foram dissolvidas, no meio de ágar, em diferentes concentrações: 100, 250

e 500 µg mL<sup>-1</sup> para a F. But. de *U. ruziziensis*, e 50, 100 e 250 µg mL<sup>-1</sup> para a protodioscina. Para cada tratamento foram realizadas cinco repetições. Após a semeadura, as placas foram submetidas à luz UV em uma capela de fluxo laminar, por 15 minutos. Posteriormente, as mesmas foram fechadas com filme plástico e tampadas para posterior distribuição em uma câmara de germinação vertical. As gerboxes de *I. grandifolia* foram mantida à temperatura constante de 30 °C, com fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro), enquanto *D. insularis* foi mantida em um fotoperíodo ajustado para 8 horas no claro, na temperatura de 30 °C, e por 16 horas no escuro, na temperatura de 20 °C. As sementes foram consideradas germinadas quando emitiram cerca de 2 mm de radícula além do tegumento. Essas foram contadas diariamente até completarem 120 horas de incubação. Ao final deste período, as plântulas foram medidas e pesadas para a determinação do crescimento das raízes, das partes aéreas e análise das biomassas frescas das plântulas. Em seguida, o material foi levado à estufa, por 48 horas, a 60 °C, para posterior obtenção das biomassas secas das plântulas. A contagem das sementes foi utilizada para os cálculos do tempo médio de germinação (TMG) (Labouriau and Osborn 1984); índice de velocidade de germinação (IVG) (Chiapusio et al. 1997) e velocidade de germinação acumulada (VGA) (Chiapusio et al. 1997).

O TMG foi calculado por meio da Equação I:

$$TMG = \sum ni.ti / \sum ni \quad (I)$$

Onde, TMG: Tempo médio de germinação; *ni*: Número de sementes germinadas entre o tempo  $t_{i-1}$  e  $t_i$ .

O IVG foi calculado por meio da Equação II:

$$IVG = (N_1 / T_1) + (N_2 - N_1) \times 1/2 + (N_3 - N_2) \times 1/3 + \dots (N_n - N_{n-1}) \times 1/n \quad (II)$$

Onde, IVG: Índice de velocidade de germinação; N: Proporção de sementes germinadas obtidas no primeiro ( $T_1$ ), segundo ( $T_2$ ), terceiro ( $T_3$ )..., (N-1) h.

A VGA foi calculada por meio da Equação III:

$$VGA = (N_1 / T_1) + (N_2 / T_2) + (N_3 / T_3) + \dots (N_n / n) \quad (III)$$

Onde, VGA: Velocidade de germinação acumulada; N: Proporção de sementes germinadas obtidas no primeiro ( $T_1$ ), segundo ( $T_2$ ), terceiro ( $T_3$ )..., h.

Para os estudos subsequentes, foram utilizadas as concentrações de cada tratamento que causaram aproximadamente 50% de inibição no crescimento das raízes (valores de IC<sub>50</sub>) de *I. grandifolia* e de *D. insularis*. As concentrações de IC<sub>50</sub> foram calculadas por interpolação numérica por meio da função *spline* cúbica usando o software GraphPad Prism 5.

#### *Determinação da atividade respiratória de ápices radiculares*

A respiração de ápices radiculares de ambas as espécies crescidas, por 120 horas, na ausência ou na presença de F. But. de *U. ruziziensis* ou protodioscina nas respectivas concentrações de IC<sub>50</sub>, foi medida, a 25 °C, com o auxílio de um eletrodo de oxigênio tipo Clark, inserido em uma câmara de acrílico e conectado a um polarógrafo (Bracht e Ishii-Iwamoto 2003). Aproximadamente 20 mg de ápices

radiculares foram retirados, pesados e imediatamente transferidos para uma câmara de acrílico contendo 2 mL do meio de incubação, composto de solução nutritiva:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2 mM,  $\text{KNO}_3$  2 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,43 mM,  $\text{MgSO}_4$  0,75 mM e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20  $\mu\text{M}$  (Larkin 1987), com pH ajustado para 5,8. A velocidade de consumo de oxigênio foi expressa em nmoles de oxigênio consumidos por minuto e relacionada à quantidade de tecido, em miligramas, utilizada para a medida polarográfica. Para esses cálculos a concentração de  $\text{O}_2$  dissolvido no meio de incubação, a 25 °C, foi considerada como sendo de 240 mM (Estabrook 1967). Para discriminar a respiração via citocromo-oxidase (COX) da respiração via oxidase alternativa (AOX) e da respiração devida às oxidases extra-mitocondriais, o cianeto de potássio (KCN) (250  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado cerca de 5 minutos após a adição dos ápices. Nesta condição, o consumo de oxigênio residual foi definido como respiração KCN-insensível. O consumo de oxigênio inibido pelo KCN foi definido como respiração KCN-sensível.

#### *Determinação de proteínas*

A concentração de proteínas dos extratos enzimáticos foi determinada pelo método de Bradford (1976), sendo utilizada a albumina bovina como padrão.

#### *Determinação da atividade da enzima malato desidrogenase*

Aproximadamente 25-50 mg de raízes de plântulas de *I. grandifolia* e *D. insularis* crescidas por 120 horas, em ágar 0,8% (p/v), e tratadas com a F. But. de *U. ruziziensis* ou protodioscina nas respectivas concentrações de  $\text{IC}_{50}$  foram cortadas e maceradas em um meio contendo tampão HEPES 0,1 M (pH 7,5), 2-mercaptoetanol 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM, ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 2 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,1 mM e albumina de soro bovino (BSA) 1%. O extrato foi centrifugado a 11.000 g, por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante, contendo as enzimas foi incubado com tampão fosfato 95 mM, oxaloacetato 0,5 mM e NADH 0,2 mM. A atividade da malato desidrogenase foi determinada seguindo a oxidação de NADH (Queiroz 1969), em espectrofotômetro, a 340 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar do NADH de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### *Determinação da permeabilidade das raízes aos íons*

A determinação da permeabilidade de raízes aos íons seguiu o procedimento de Baziramakenga et al. (1995), com modificações. As plântulas crescidas por 120 horas em ágar 0,8%, tratadas ou não com F. But. de *U. ruziziensis* ou protodioscina nas respectivas concentrações de  $\text{IC}_{50}$  tiveram suas raízes excisadas, pesadas e imersas em béquer contendo 30 mL de água deionizada para *I. grandifolia*, e 20 mL para *D. insularis*, à temperatura ambiente. As raízes ficaram em repouso durante 4 horas, e no final deste período (T4) a condutividade elétrica foi medida através de um condutivímetro (Tecnal TEC-4MP). Em seguida, as raízes foram transferidas para outro béquer com 30 mL ou 20 mL de água deionizada, conforme a espécie, levadas para fervura por 15 minutos e, à temperatura ambiente, a condutividade elétrica foi novamente determinada (TF). A taxa de condutividade foi determinada por  $(T4 / TF + T4) \times 100$ , e expressa em porcentagem. A célula do condutivímetro usada para esse experimento foi a número 1 e a célula padrão foi de  $146,9 \mu\text{S cm}^{-1}$ .

#### *Medidas da atividade de enzimas do sistema antioxidante*

Aproximadamente 25-100 mg de raízes de plântulas crescidas por 120 horas em ágar 0,8%, tratadas ou não com F. But. de *U. ruziziensis* ou protodioscina, nas respectivas concentrações de IC<sub>50</sub>, foram transferidas para um almofariz e cuidadosamente maceradas com 1 mL de meio de extração contendo tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) e 0,1% de polivinilpirrolidona (PVP). Os extratos foram, em seguida, centrifugados durante 30 minutos a 6.000 g, a 4 °C. O sobrenadante foi usado como fonte das enzimas.

A atividade da catalase (CAT) foi medida em um meio contendo tampão fosfato 100 mM (pH 6,8), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,6 M e do extrato da enzima (0,01-0,05 mg de proteína). O consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi monitorado em espectrofotômetro a 240 nm ( $\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Aebi 1984).

A atividade da peroxidase (POD) foi medida em um meio contendo tampão fosfato 100 mM (pH 6,8), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,6 mM, pirogalol 0,6 mM e do extrato da enzima (0,01-0,05 mg de proteína). A atividade da POD foi calculada pela determinação da quantidade de purpurogalina formada, acompanhada em espectrofotômetro a 470 nm ( $\epsilon = 25,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Pütter 1974).

A atividade da glutatona redutase (GR) foi medida em um meio contendo tampão fosfato 100 mM (pH 7,5), EDTA 0,2 mM, GSSG 1 mM, NADPH 5 mM e do extrato da enzima (0,01-0,05 mg de proteína). O consumo de NADPH foi monitorado em espectrofotômetro a 340 nm ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Foyer e Halliwell 1976).

Atividade da superóxido dismutase (SOD) foi monitorada de acordo com (Giannopolitis e Ries 1977). O meio de reação continha tampão fosfato 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,2 M, metionina 238 mM, NBT 18,75 mM, riboflavina 30  $\mu\text{M}$  e do extrato da enzima (0,01-0,05 mg de proteína). A reação foi iniciada com a exposição à luz (20 W) onde permaneceu durante 45 minutos a 30 °C. Uma unidade de atividade de SOD (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a oxidação do nitroazul de tetrazólio (NBT). A taxa de fotoredução foi lida em espectrofotômetro a 560 nm, e os resultados foram expressos como U de SOD mg de proteína<sup>-1</sup>.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi medida em um meio contendo tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), ascorbato 50 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM e do extrato da enzima (0,01-0,05 mg de proteína). A oxidação do ascorbato foi medida em espectrofotômetro a 290 nm ( $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Nakano e Asada 1981).

#### *Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA) e de dienos conjugados das raízes das plântulas*

Aproximadamente 25-100 mg de raízes das plântulas crescidas por 120 horas em ágar 0,8%, tratadas ou não com F. But. de *U. ruziziensis* ou protodioscina nas respectivas concentrações de IC<sub>50</sub> foram retiradas e maceradas com 0,5 mL de etanol 96%, a 4 °C. Em seguida, uma alíquota de 0,2 mL foi retirada deste homogenato inicial, e misturada com um volume de 0,8 mL de ácido 2-tiobarbitúrico (dissolvido em TCA 10%), em tubos tipo falcon com fundo cônico. Após incubação a 95 °C, por 30 minutos, a reação foi paralisada adicionando o tubo em banho de gelo. A amostra foi centrifugada a 15.000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi removido e a absorbância foi medida a 532 nm e a 600 nm.

A diferença entre esses dois comprimentos de onda foi utilizada para o cálculo do conteúdo de MDA ( $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Heath e Packer 1968). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  (de biomassa fresca).

Para medir o conteúdo de dienos conjugados, uma alíquota de 75  $\mu\text{L}$  do homogenato inicial foi misturada em um volume de 1425  $\mu\text{L}$  de etanol 96% em um tubo do tipo *ependorf* que foi, em seguida, centrifugado a 20.000  $g$  por 20 minutos (Boveris et al. 1980). A absorvância do sobrenadante foi registrada em espectrofotômetro a 234 nm e a 500 nm. A diferença entre esses dois comprimentos de onda foi utilizada para o cálculo da concentração dos dienos conjugados, usando o  $\epsilon = 2,65 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  (de biomassa fresca).

#### *Anatomia e morfologia das raízes das plântulas*

Para os estudos anatômicos e morfológicos foram utilizadas as plântulas de *I. grandifolia* e de *D. insularis* incubadas por 120 horas, em meio de ágar 0,8%, na ausência ou presença de F. But. de *U. ruziziensis* ou de protodioscina, em suas respectivas concentrações de  $\text{IC}_{50}$ . Para a análise morfológica, as raízes primárias de *I. grandifolia* e as raízes adventícias de *D. insularis* foram selecionadas randomicamente, e posteriormente observadas e fotografadas em microscópio estereoscópico Leica EZ4D com câmera digital embutida.

Para a análise anatômica, as raízes primárias de *I. grandifolia* e as raízes adventícias de *D. insularis* foram, também, escolhidas randomicamente, fixadas em fixador CRAF de Nawaschin, e armazenadas em etanol 70% (Berlyn and Miksche 1976). Algumas raízes do controle e dos tratamentos fixadas em CRAF, foram novamente selecionadas randomicamente e incluídas em historresina Leica, conforme orientação do fabricante. O material incluído na historresina foi seccionado em micrótomo de rotação para produção de cortes anatômicos transversais, com 7  $\mu\text{m}$  de espessura, utilizados na montagem de lâminas permanentes. As secções foram coradas com azul de toluidina em tampão acetato (pH 4,7) (O'Brien et al. 1964, modificado). A documentação fotográfica das lâminas foi feita em microscópio de luz Leica ICC 50 com câmera digital acoplada, utilizando-se o software Leica Application Suite versão 1.8. Todas as amostras foram preparadas com escala correspondente ao aumento observado.

#### *Análise estatística*

Os dados apresentados nos gráficos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (EP); estes foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), com diferenças significativas entre as médias identificadas pelo teste de *Duncan*.  $P < 0,05$  foi adotado como critério mínimo de significância. As análises foram realizadas utilizando o pacote de software Statistica<sup>TM</sup>.

## RESULTADOS

#### *Efeitos da F. But. de U. ruziziensis e da protodioscina sobre a germinação e crescimento inicial de I. grandifolia e D. insularis*

A F. But. de *U. ruziziensis* na faixa de concentração de 100, 250 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ou com protodioscina na faixa de concentração de 50, 100, e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  induziu efeitos diferenciais sobre a germinação das sementes de *I. grandifolia* e *D. insularis* (Tabela 1). A *I. grandifolia* foi pouco sensível



aos tratamentos, mas *D. insularis* apresentou bastante sensibilidade. Nesta última, os efeitos foram mais pronunciados no tratamento com a F. But. de *U. ruziziensis* quando comparados com a protodioscina. A F. But. de *U. ruziziensis* causou inibições dose-dependentes no IVG e VGA. O IVG foi reduzido em 33%, 41% e 61% e a VGA em 23%, 30% e 57%, nos tratamentos com 100, 250 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 1). Foi também observado um aumento de 21% no TMG, na concentração de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de F. But. de *U. ruziziensis*. A protodioscina, por sua vez, aumentou o TMG (+22%) e reduziu o IVG (-50%) e o VGA (-57%) somente na maior concentração testada de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 1).

Apesar da diferença de sensibilidade em relação ao processo germinativo, o desenvolvimento inicial das plântulas de ambas as espécies foi igualmente sensível às substâncias ativas contidas na F. But. de *U. ruziziensis* e também à protodioscina (Fig. 2). Ambas sofreram alterações no crescimento das raízes e/ou dos caules (Fig. 2a, b, c, d). Em termos gerais, a F. But. de *U. ruziziensis* foi menos ativa do que a protodioscina em ambas as espécies. Enquanto a protodioscina alterou todos os parâmetros de crescimento avaliados, a F. But. de *U. ruziziensis* não alterou significativamente as biomassas fresca e seca das plântulas de *D. insularis* (Fig. 2f, h). Os valores de  $\text{IC}_{50}$  para a inibição no crescimento das raízes traduzem em termos gerais as diferenças observadas. Na *I. grandifolia* o  $\text{IC}_{50}$  foi de 230  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para a F. But., e de 54  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para a protodioscina. Na *D. insularis* os valores correspondentes foram de 108  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para a F. But., e de 34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para a protodioscina.

Para os estudos subsequentes os valores de  $\text{IC}_{50}$  referentes às inibições do crescimento radicular causadas pela F. But. de *U. ruziziensis* e pela protodioscina em cada espécie foram utilizadas.

#### *Efeitos da F. But. de U. ruziziensis e da protodioscina sobre a atividade respiratória de ápices radiculares de I. grandifolia e D. insularis*

O consumo total de  $\text{O}_2$  (respiração total) dos ápices radiculares de *I. grandifolia* foi notavelmente menor em comparação com o de *D. insularis* (Fig. 3a, b). A fração do consumo de oxigênio sensível ao cianeto (respiração KCN-sensível) foi de 72% e 47% da respiração total em *I. grandifolia* e *D. insularis*, respectivamente (Fig. 3c, d). Esta fração representa a respiração mitocondrial via citocromo-oxidase (COX) que está acoplada à fosforilação do ADP, enquanto que o restante da respiração total (respiração KCN-insensível) é devido ao consumo de oxigênio por outras oxidases mitocondriais, como a oxidase alternativa (AOX) e oxidases extra-mitocondriais (Abrahim et al. 2003; Ishii-Iwamoto et al. 2006).

Os efeitos dos tratamentos com a F. But. de *U. ruziziensis* ou a protodioscina, nas respectivas doses  $\text{IC}_{50}$  de inibição no crescimento radicular, foram bem diferentes nas duas espécies. A F. But. de *U. ruziziensis* causou em *I. grandifolia* um aumento de 92% na respiração total (Fig. 3a), que foi devido a um aumento tanto na respiração KCN-sensível (+101%) quanto da KCN-insensível (+67%) quando comparados com os respectivos valores do controle (Fig. 3a, c, e). Já em *D. insularis*, o único efeito significativo da F. But. de *U. ruziziensis* foi uma redução de 47% na respiração KCN-sensível (Fig. 3d).

A respiração dos ápices de ambas as espécies foi bem menos afetada pelo tratamento com a protodioscina. Em *I. grandifolia* houve apenas um estímulo de 60% na respiração KCN-insensível (Fig. 3e), enquanto que em *D. insularis* a protodioscina não alterou nenhuma das atividades respiratórias (Fig. 3b, d, f).

*Efeitos da F. But. de U. ruziziensis e da protodioscina sobre a atividade da enzima malato desidrogenase das raízes de I. grandifolia e D. insularis*

A malato desidrogenase (MDH) ocorre tanto no citosol como na matriz mitocondrial. Na matriz mitocondrial é uma enzima do ciclo do ácido cítrico que gera NADH, um dos substratos da cadeia respiratória (Buchanan et al. 2015). A MDH citosólica participa de vias biossintéticas que requerem poder redutor-oxidante da dupla NADH/NAD<sup>+</sup> (Hara et al. 2006; Scandalios 1974). Nos extratos das raízes primárias ambas as iso-formas (MDH mitocondrial e citosólica) provavelmente contribuíram para a atividade enzimática medida.

A Fig. 4 mostra que a atividade da malato desidrogenase foi consideravelmente maior nos extratos das raízes de *D. insularis* do que nos de *I. grandifolia*. Os tratamentos com a F. But. de *U. ruziziensis* e a protodioscina só influenciaram a atividade da enzima na *D. insularis*. Nesta espécie, a F. But. de *U. ruziziensis* e protodioscina inibiram em 28% e 20%, respectivamente, a atividade da enzima quando comparada com o controle (Fig. 4b).

*Efeitos da F. But. de U. ruziziensis e da protodioscina sobre a atividade de enzimas do sistema antioxidante das raízes de I. grandifolia e D. insularis*

A Fig. 5 apresenta as atividades, em *I. grandifolia* e *D. insularis*, das cinco enzimas do sistema antioxidante analisadas neste trabalho. A comparação das atividades enzimáticas dos ensaios controles, com base no conteúdo de proteínas do extrato das raízes, indicou que as duas espécies possuem um conjunto de atividades distintas. As atividades da SOD, CAT e APX são maiores na *D. insularis* do que na *I. grandifolia*. As atividades da GR e da POD são similares nas duas espécies.

Os tratamentos com F. But. de *U. ruziziensis* e a protodioscina (IC<sub>50</sub>) exerceram efeitos muito diferentes nas duas espécies. Em *I. grandifolia*, a F. But. de *U. ruziziensis* estimulou a atividade da SOD (+310%) e da POD (+28%), mas inibiu a atividade da CAT (-47%) e da GR (-50%). Em *D. insularis* a F. But. de *U. ruziziensis* não alterou a atividade da SOD, estimulou a atividade da CAT (+26%) e inibiu a POD (-34%). Além da SOD, as atividades da GR e da APX também não foram modificadas.

O tratamento com protodioscina exerceu efeitos distintos nas duas espécies, mas similares aos efeitos da F. But. de *U. ruziziensis*. Em *I. grandifolia* houve estímulo da SOD (+304%) e da POD (+35%) e inibição da CAT (-32%); e em *D. insularis*, a protodioscina não alterou a SOD, a GR e a APX, mas estimulou a CAT (+32%) e inibiu a POD (-18%), tal como observado com a F. But. de *U. ruziziensis*.

*Efeitos da F. But. de U. ruziziensis e da protodioscina sobre o conteúdo de malondialdeído (MDA) e dienos conjugados e sobre a permeabilidade aos íons das raízes de I. grandifolia e D. insularis*

Os efeitos evidenciados sobre a atividade respiratória e sobre as enzimas do sistema antioxidante sugerem que a F. But. de *U. ruziziensis* e a protodioscina podem causar toxicidade às duas plantas daninhas, seja por interferência no metabolismo energético ou por induzir danos oxidativos devido às EROs. As EROs reagem com os ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídeos das membranas, levando à peroxidação e à formação de produtos secundários, principalmente aldeídos, como o malondialdeído (MDA) (Kappus 1985; Maness et al. 1999) e também de dienos conjugados (Recknagel e

Glende 1984). As consequências dos danos oxidativos, bem como de uma interferência no metabolismo energético são alterações nas propriedades das membranas celulares, incluindo a permeabilidade aos íons. Estas possibilidades foram investigadas avaliando-se os conteúdos de MDA e de dienos conjugados das raízes de *I. grandifolia* e de *D. insularis*, bem como a permeabilidade das raízes aos íons.

Os resultados do tratamento com a F. But. de *U. ruziziensis* ou com a protodioscina revelaram sinais de danos químicos e funcionais das membranas das raízes das duas espécies de plantas daninhas estudadas. Em *I. grandifolia*, a F. But. de *U. ruziziensis* reduziu o conteúdo de MDA (-46%), mas houve aumento do conteúdo de dienos conjugados (+115%) e aumento da permeabilidade das raízes aos íons (+52%) (Fig. 6a, c, e). Em *D. insularis* a F. But. de *U. ruziziensis* também aumentou o conteúdo de dienos conjugados (+41%) e a permeabilidade das raízes aos íons (+57%) (Fig. 6d, f).

Os efeitos da protodioscina foram muito similares aos induzidos pela F. But. de *U. ruziziensis* em *I. grandifolia* mas não em *D. insularis*. Em *I. grandifolia* houve redução do conteúdo de MDA (-45%), aumento do conteúdo de dienos conjugados (+101%) e aumento da permeabilidade aos íons das raízes(+53%) (Fig. 6a, c, e). Em *D. insularis*, a protodioscina alterou somente a permeabilidade das raízes aos íons em 38% (Fig. 6f). Não houve alteração no conteúdo de MDA ou de dienos conjugados.

#### Efeitos da F. But. de *U. ruziziensis* e da protodioscina sobre a anatomia e morfologia das raízes de *I. grandifolia* e *D. insularis*

As análises anatômicas e morfológicas foram realizadas utilizando amostras de raízes primárias de plântulas de *I. grandifolia*, e raízes adventícias de plântulas de *D. insularis*, retiradas após incubação por 120 horas, em meio de ágar 0,8%, na ausência (controle) ou presença de F. But. de *U. ruziziensis* ou protodioscina, nas concentrações IC<sub>50</sub> para inibição do crescimento radicular nas respectivas espécies.

Conforme mostrado na Fig. 7a, a raiz-controle de *I. grandifolia* apresentou-se alongada, as raízes laterais estavam ausentes na região próxima ao ápice, estando estas presentes apenas próximas à zona de transição da raiz com o caule (região não captada pela imagem). As raízes de *I. grandifolia* sob tratamento com a F. But. de *U. ruziziensis* apresentaram-se muito semelhantes às raízes tratadas com a protodioscina, havendo um notável encurtamento das raízes, juntamente com a presença de raízes laterais próximas ao ápice radicular e o escurecimento de toda a extensão da raiz observada (Fig. 7b, c).

Quanto à análise morfológica de *D. insularis*, apesar do encurtamento das raízes observado em ambos os tratamentos em relação ao controle, os efeitos observados foram aparentemente mais brandos nesta espécie que em *I. grandifolia* (Fig. 7d, e, f).

Em *I. grandifolia* a raiz é axial com ramificações restritas à base próximo do colo. A raiz-controle consiste de epiderme unisseriada (Fig. 8c), com células de contorno isodiamétrico, cuja parede periclinal interna é levemente sinuosa. Não foram observados pelos em toda a extensão da raiz. No córtex (Fig. 8b, c) distinguem-se endoderme com estrias de Caspary e parênquima plurisseriado, onde se destacam células amplas de aspecto secretor, que sofrem dissolução da parede celular, formando notáveis cavidades no córtex (Fig. 8a, c). No cilindro central, o periciclo é parenquimático, unisseriado, com células leve e radialmente alongadas (Fig. 8a, b). O cilindro é ainda tetrarco, com quatro cordões de floema alternados com os de xilema (Fig. 8b). Em raiz-controle mais desenvolvida, a estrutura geral se mantém, mas as cavidades corticais se ampliam com a dissolução de outras células contíguas à cavidade

inicialmente formada (Fig. 8d). Na base da raiz, as células são mais comprimidas, com paredes mais sinuosas. A epiderme, nesta fase e nesta região, se destaca por apresentar células muito comprimidas em virtude do notável crescimento das cavidades corticais (Fig. 8d).

As raízes de *I. grandifolia* tratadas com a F. But. de *U. ruziziensis* apresentaram semelhanças morfológicas com as raízes tratadas com protodioscina, sofrendo processo de redução de tamanho; no ápice da raiz distinguem-se restos celulares de coifa ao longo da superfície (Fig. 8e). A epiderme apresentou-se semelhante ao tratamento com a protodioscina (Fig. 8e), apresentando-se, entretanto, de organização mais uniforme na base da raiz como na raiz-controle. No córtex, a endoderme é semelhante à da raiz-controle, e o parênquima também tem cavidades mais desenvolvidas que as da raiz-controle, mas de menor dimensão quando comparadas com as raízes tratadas com protodioscina (Fig. 8e, f). É digno de registro que ao longo da raiz nota-se que as cavidades maiores se formam somente de um lado do córtex, na direção contrária à formação da ramificação. A ramificação da raiz inicia muito próximo ao ápice (Fig. 8f). A formação de câmbio de origem procambial inicia logo abaixo da região apical (Fig. 8g). A raiz também é tetrarca, com aumento dos tecidos vasculares, observando-se que em cada cordão do floema, ocorre um tubo crivado amplo (Fig. 8g). Próximo à base, os tecidos são semelhantes aos tratados com protodioscina, com variação em relação ao câmbio, que está bem estabelecido, e a formação de grande cavidade central (Fig. 8h).

As raízes de *I. grandifolia* submetidas ao tratamento de protodioscina sofreram espessamento e redução no comprimento, mantendo-se a coifa no ápice da raiz (Fig. 7c, 8j). A epiderme destas raízes é descontínua, formada por células alongadas tangencialmente (Fig. 8j). No córtex, a endoderme está presente, assim como tecido parenquimático (Fig. 8k). As cavidades corticais se formam na região apical da raiz (Fig. 8i) e tornam-se gradativamente ampliadas em direção à base da raiz (Fig. 8l), com dissolução de novas células, comprimindo o córtex. A raiz sob tratamento tem periciclo parenquimático unisseriado e é tetrarca (Fig. 8k), mas há aumento significativo dos tecidos vasculares, principalmente em direção à base, onde se observa o desenvolvimento de câmbio de origem procambial (Fig. 8k), não observado na raiz-controle. A região basal da raiz se caracteriza por apresentar maior desenvolvimento dos tecidos secundários, das cavidades e da formação de ramificação (Fig. 8l).

Nas análises em *D. insularis*, as raízes adventícias em condições normais de crescimento apresentaram epiderme unisseriada, com células de paredes delgadas e pelos unicelulares (Fig. 9a, b), córtex parenquimático, com três camadas celulares, em que a exoderme é indistinta e a endoderme possui células com espessamento em U (Fig. 9a, b), cilindro central composto de periciclo parenquimático, interrompido por células do protoxilema (Fig. 9c) e cinco cordões de xilema alternados com os cordões de floema. As raízes são, portanto, pentarcas com um elemento de metaxilema central (Fig. 9c).

No caso das raízes adventícias de *D. insularis* submetidas ao tratamento com F. But. de *U. ruziziensis*, não houve grandes mudanças na estrutura da raiz (Fig. 9d). A epiderme é descontínua, com células mais arredondadas e exoderme apresenta células com espessamento parietal sob forma de U (Fig. 9e). As células endodérmicas são comprimidas e apresentam lume reduzido (Fig. 9f).

Finalmente, as raízes de *D. insularis* sob tratamento com protodioscina não mostraram alterações estruturais significativas, quando comparadas com as raízes-controle (Fig. 9g), exceto por apresentar a camada subepidérmica (exoderme) com células providas de espessamento em U, semelhante às células da

endoderme (Fig. 9h). O cilindro central em ambos os tratamentos não apresentou alteração significativa (Fig. 9f, i).

## DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho revelaram que a planta daninha da classe das dicotiledôneas *I. grandifolia*, e a *D. insularis*, uma representante das monocotiledôneas, apresentam diferentes sensibilidades ao tratamento com a F. But. de *U. ruziziensis* e com um de seus componentes, a saponina esteroidal protodioscina. Uma das diferenças notáveis entre as duas espécies foi no processo de germinação. A germinação da *I. grandifolia* foi pouco alterada, contrastando com uma inibição significativa na germinação da *D. insularis*, especialmente pela F. But. de *U. ruziziensis*.

Muitos fatores podem ter contribuído para esta diferença, mas a estrutura e a propriedade do tegumento externo das sementes exerceram, muito provavelmente, grande influência na velocidade de captação das substâncias ativas durante o processo de embebição das sementes. Aparentemente a captação das substâncias contidas na F. But. de *U. ruziziensis* ou da protodioscina foi maior na *D. insularis*, já que a germinação desta espécie foi alterada. Por outro lado, o tegumento externo da *I. grandifolia* é de fato bastante resistente, como pode ser inferido pela necessidade de escarificação química com ácido sulfúrico concentrado para que a germinação ocorra. Entretanto, esta característica não é comum de todas as sementes da classe das dicotiledôneas, pois tanto as sementes de dicotiledôneas quanto de monocotiledôneas possuem tegumento externo com características específicas para cada espécie (Martin 1946). Deve-se levar em conta também que a germinação depende de vários outros fatores intrínsecos da semente, exigindo um conjunto de requisitos específicos para o sucesso da germinação (Mondo et al. 2010).

Após a germinação ter sido completada, as plântulas tanto da *I. grandifolia* como da *D. insularis* foram sensibilizadas pela F. But. de *U. ruziziensis* ou pela protodioscina, indicando que houve efetiva interação com os tecidos que compõem as plântulas resultantes. Nas duas espécies houve redução do crescimento das raízes e dos caules, com efeitos mais pronunciados causados pela protodioscina se comparados com os efeitos da F. But. de *U. ruziziensis*, conforme revelaram os valores de  $IC_{50}$  relativos aos efeitos sobre o comprimento da raiz. Para a F. But. *U. ruziziensis*, os valores foram de  $230 \mu\text{g mL}^{-1}$  em *I. grandifolia* e para a *D. insularis* de  $108 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para a protodioscina os valores correspondentes foram de  $54 \mu\text{g mL}^{-1}$  em *I. grandifolia* e de  $34 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a *D. insularis*.

Embora seja um dos componentes da F. But. *U. ruziziensis*, a protodioscina não é a única substância presente nessa fração. As análises preliminares realizadas por meio de cromatografia de líquida de alta eficiência (em inglês, HPLC) revelaram que a protodioscina representa cerca de 50% (peso/peso) da F. But. de *U. ruziziensis* (dados não publicados). Assim, parece haver uma boa correspondência entre o conteúdo de protodioscina nesta fração e os efeitos diretos da protodioscina, especialmente nos efeitos sobre a *I. grandifolia*.

Nas imagens obtidas por meio de microscopia óptica através do estereoscópio pôde-se observar que a redução no crescimento das raízes de *I. grandifolia* tanto pela F. But. de *U. ruziziensis* quanto pela protodioscina foi decorrente de uma drástica alteração morfológica. As raízes primárias não se

expandiram longitudinalmente, como as raízes do controle, e próximo ao ápice surgiram estruturas secundárias, que em alguns casos já se diferenciaram em raízes laterais.

As medidas da atividade respiratória dos ápices radiculares de ambas as espécies submetidas ao tratamento com a F. But. de *U. ruziziensis* ou com protodioscina forneceram evidências importantes para o entendimento do provável modo de ação pelos quais as substâncias ativas alteraram o desenvolvimento das plântulas.

A respiração total dos ápices radiculares representa a soma de todas as reações que consomem oxigênio dos tecidos, sendo essas de origem mitocondrial ou extra-mitocondrial. Cerca de 80 a 90% do consumo celular de oxigênio é utilizado para atender as necessidades energéticas da célula através da fosforilação oxidativa mitocondrial via COX (Babcock 1999). As mitocôndrias vegetais, entretanto, apresentam uma via alternativa de transferência de elétrons, que transfere os elétrons do ubiquinol diretamente ao O<sub>2</sub>, não passando pelo complexo IV. O fluxo de elétrons por esta via, através da AOX não é sensível aos inibidores clássicos do complexo IV (CN<sup>-</sup>, N<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO, NO); e pode contribuir para o consumo de O<sub>2</sub> pela mitocôndria juntamente com a via da COX (Buchanan et al. 2015). Sua proporção relativa é variável dependendo do órgão ou do tecido da planta, da espécie, ou mesmo das condições metabólicas em que estas se encontram (Moore e Siedow 1991; Popov et al. 1997; Buchanan et al. 2015).

Além das vias COX e AOX, uma pequena parte do oxigênio pode ser consumida pelas oxidases extra-mitocondriais, que por sua vez, são representadas por enzimas do sistema monooxigenase, lipoxigenases e NADPH oxidases, entre outras (Bendall e Bonner 1971; Parrish e Leopold 1978). Assim, a respiração KCN-insensível representa a contribuição da via AOX somada às oxidases extra-mitocondriais (Ishii-Iwamoto et al. 2006).

Caso o efeito primário fosse uma inibição acentuada na respiração via COX (KCN-sensível), haveria um comprometimento na produção de ATP e, por consequência, em processos dependentes de ATP, incluindo a síntese de proteínas e de DNA, bem como os sistemas de transporte de membrana plasmática dependente de ATPases. Um efeito desta natureza foi sugerido, por exemplo, para as ações de aleloquímicos como 2(3H)-benzoxazolinona (BOA) e 2,4-dihydroxi-1,4(2H)-benzoxazin-3-one (DIBOA) em plântulas de arroz (Burgos et al. 2004) e também para as ações da chalcona (1,3-diphenil-2-propen-1-ona) em *Arabidopsis thaliana* (Díaz-Tielas et al. 2012). Nesses casos, entretanto, as raízes não se desenvolvem normalmente, aparecendo sinais de necrose especialmente nos meristemas apicais, como foi evidenciado também nas ações do monoterpene  $\alpha$ -pineno, um inibidor da produção mitocondrial de ATP em plântulas de milho (Ishii-iwamoto et al. 2012).

A análise dos resultados da atividade respiratória revelou que somente a F. But. de *U. ruziziensis* exerceu uma redução significativa na respiração via COX mitocondrial dos ápices radiculares de *D. insularis*, inibindo também a atividade da malato desidrogenase, uma enzima que atua na geração de NADH necessário para alimentar o fluxo de elétrons na cadeia respiratória. Em *I. grandifolia*, a F. But. de *U. ruziziensis* não inibiu a respiração via COX e, embora a protodioscina tenha causado diversas alterações no desenvolvimento das plântulas tanto de *I. grandifolia* como de *D. insularis*, esta substância não exerceu efeito na respiração via COX de ambas as espécies. Desta forma, somente na *D. insularis* tratada com a F. But. de *U. ruziziensis* um comprometimento na geração de ATP pode ter contribuído, em parte ao menos, para as alterações no desenvolvimento das plântulas.

Deve-se mencionar, entretanto, que em *I. grandifolia* a F. But. de *U. ruziziensis* estimulou a respiração KCN-sensível e a KCN-insensível e a protodioscina também estimulou a respiração KCN-insensível. Os resultados não permitem distinguir exatamente quais foram as vias estimuladas dentre as que contribuem para a respiração KCN-insensível, entretanto, tanto um estímulo tanto da AOX quanto das oxigenases extra-mitocôndrias, especialmente as lipoxigenases ou NADPH oxidases, são indicadores de estresse oxidativo celular decorrente da geração excessiva de EROs (Moore and Siedow 1991; Baker and Orlandi 1995; Lamb and Dixon 1997; Thaler 1999; Porta et al. 2002). A NADPH oxidase localizada na membrana plasmática das células é uma das principais enzimas geradoras de EROs em condições de estresse abiótico (Tripathy e Oelmüller 2012b).

Parte do aumento no consumo de oxigênio pode ser, inclusive, devido ao oxigênio convertido a superóxidos e  $H_2O_2$  na cadeia respiratória de elétrons, já que as mitocôndrias junto com os cloroplastos constituem os principais compartimentos de geração de EROs em células vegetais (Foyer et al. 1994; Foyer 1997; Blokhina and Fagerstedt 2010; Pergo and Ishii-Iwamoto 2011; Sharma et al. 2012).

Por sua vez, uma das funções da AOX é a manutenção da homeostase do oxigênio nos tecidos, reduzindo seu excesso sem interferir no suprimento deste para o complexo IV e, ao mesmo tempo, minimizando a produção de EROs nas mitocôndrias (Skutnik e Rychter 2009; Rasmusson et al. 2009; Buchanan et al. 2015).

A observação de que tanto a F. But. de *U. ruziziensis* quanto a protodioscina estimularam a respiração KCN-insensível de *I. grandifolia* é forte evidência de que ambos os tratamentos induziram uma condição de estresse oxidativo celular, hipótese que foi corroborada pelas alterações observadas nas enzimas do sistema de defesa antioxidante e nos níveis de dienos conjugados.

Os efeitos da F. But. de *U. ruziziensis* e da protodioscina sobre as enzimas do sistema antioxidante foram muito parecidos em *I. grandifolia*. Houve estímulo da atividade da SOD e da POD e redução da atividade da CAT e da GR. A SOD desempenha um papel central na defesa contra o estresse oxidativo (Scandalios 1993), sendo a primeira enzima a atuar na eliminação de EROs, dismutando o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que é altamente reativo, em  $O_2$  e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Mittler 2002). O  $H_2O_2$  é neutralizado subsequentemente por ação de outras enzimas, incluindo a CAT, GR e APX (Noctor e Foyer 1998; Navrot et al. 2007; Sharma et al. 2012). Assim, as consequências previsíveis das alterações enzimáticas causadas pela F. But. de *U. ruziziensis* e pela protodioscina em *I. grandifolia* seriam aumentos dos níveis de peróxidos de hidrogênio. A formação excessiva de EROs é prejudicial aos tecidos devido ao dano oxidativo às estruturas celulares, mas é também conhecido que algumas EROs, entre elas o  $H_2O_2$ , exercem funções fisiológicas essenciais na sinalização das ações hormonais, na abertura dos estômatos, na regulação de canais iônicos, no gravitropismo (Mittler e Berkowitz 2001) e na aclimação da planta ao estresse (Sharma et al. 2012; Buchanan et al. 2015).

Sinais de danos oxidativos foram de fato observados nas raízes de *I. grandifolia* tratadas com F. But. de *U. ruziziensis* ou protodioscina. Embora não tenha sido evidenciado um aumento no conteúdo de MDA, um produto de lipoperoxidação de lipídeos de membranas (Kappus 1985; Maness et al. 1999), houve um aumento na concentração de dienos conjugados. Os dienos conjugados são formados pelo

ataque de radicais superóxidos ( $O_2^{\cdot-}$ ) e peróxilas ( $\cdot OH$ ) a grupos metileno de ácidos graxos poliinsaturados, sendo, portanto, outro marcador da peroxidação lipídica (Smirnoff 1995).

Em *D. insularis*, as alterações encontradas nas atividades das enzimas do sistema antioxidante foram distintas e menos acentuadas do que as observadas em *I. grandifolia*. Tanto a F. But. de *U. ruzizensis* ou a protodioscina exerceram efeitos muito similares. A atividade da SOD não foi alterada significativamente, contrastando com o forte estímulo na *I. grandifolia*. A atividade da CAT foi estimulada e a da POD inibida, efeitos também opostos aos observados na *I. grandifolia*. Entretanto, o padrão de respostas encontrado em *D. insularis* foi, também, sugestivo de uma maior geração de EROs, pois o aumento da CAT pode representar uma resposta à maior produção de  $H_2O_2$ , que pode ter sido, em parte ao menos, devida à redução da atividade da POD. De fato, foi observado um aumento no conteúdo de dienos conjugados em *D. insularis* no tratamento com a F. But. de *U. ruzizensis*. A protodioscina, entretanto, não alterou o conteúdo de MDA e nem de dienos conjugados em *D. insularis*.

Aparentemente, os danos oxidativos causados por ambos os tratamentos foram menores em *D. insularis* se comparados com os encontrados em *I. grandifolia*. É possível aventar a hipótese de que a maior resistência da *D. insularis* esteja relacionada com uma maior capacidade do sistema de defesa antioxidante da planta, visto que as atividades das enzimas SOD, CAT e APX são consideravelmente maiores nesta planta se comparada com as de *I. grandifolia*.

As análises anatômicas das raízes tratadas nas mesmas condições experimentais dos ensaios anteriores permitem um diagnóstico das consequências do estresse oxidativo induzido tanto pela F. But. de *U. ruzizensis* como pela protodioscina. Corroborando com as alterações na atividade respiratória e nas atividades das enzimas do sistema antioxidante, a *D. insularis* foi a espécie que apresentou menor alteração estrutural nos tecidos, conforme pôde ser visualizado nos cortes transversais, embora modificações no crescimento e na morfologia das raízes tenham sido observadas.

Em ambas as espécies, as alterações anatômicas não indicaram *déficit* energético pronunciado ou modificações drásticas nas estruturas de membranas, pois as células da epiderme, córtex ou dos tecidos vasculares apresentaram números, formatos e tamanhos próximos às das raízes do controle, com algumas modificações, mas que não são típicas de necrose, por exemplo. Neste caso haveria desorganização estrutural das camadas celulares e a presença de células hipertróficas ou rompidas (Burgos et al. 2004; Díaz-Tielas et al. 2012; Ishii-iwamoto et al. 2012).

Deve-se mencionar, entretanto, que nas raízes de *I. grandifolia* foram identificadas células maiores no parênquima da região do córtex, com aspecto secretor, que sofreram dissolução da parede celular, formando cavidades semelhantes aos aerênquimas. Estas cavidades já se encontravam presentes nas raízes do controle, mas foram bastante acentuadas pelo tratamento com F. But. de *U. ruzizensis* e mais ainda pela protodioscina. Estas cavidades não foram observadas nas raízes de *D. insularis*.

Os aerênquimas são estruturas típicas de raízes que crescem em condições de menor concentração de oxigênio, como em condição de alagamento. Nestas condições, a formação dos aerênquimas, juntamente com um engrossamento das paredes celulares, previne a perda radial de oxigênio e, conectados aos caules, mantêm a difusão dos gases para permitir a sobrevivência em uma condição de *déficit* de  $O_2$  (Colmer 2003).



É possível que nas condições experimentais utilizadas para o crescimento das duas espécies, ou seja, em meio de cultivo ágar 0,8%, uma relativa hipóxia tenha ocorrido na região de crescimento das raízes, visto que o meio de ágar é gelatinoso, o que poderia ter dificultado as trocas gasosas com o meio ambiente. Independente desta condição, as plântulas controles da *I. grandifolia* desenvolveram-se sadias. Não foram observadas estruturas semelhantes na *D. insularis*, fato que pode ser explicado pela menor dimensão de suas raízes e plântulas e, portanto, menor necessidade de oxigênio se comparada com a *I. grandifolia*. As cavidades aumentaram substancialmente nos tratamentos, sendo pouco provável que tenha ocorrido uma redução na concentração de oxigênio do meio. É conhecido que os aerênquimas também são formados em outras condições que não a hipóxia, como por exemplo, na deficiência nutricional (Siyiannis et al. 2012; Maniou et al. 2014). Este também não deve ser a causa do aumento das cavidades, caso elas sejam aerênquimas, visto que as plântulas desenvolveram em um meio isento de nutrientes, utilizando apenas as reservas das sementes.

A hipótese mais provável para este fenômeno, juntamente com o precoce desenvolvimento de estruturas secundárias em *I. grandifolia*, e também para o notável encurtamento das raízes em ambas as espécies é a de que a F. But. de *U. ruziziensis*, bem como a protodioscina, causaram um distúrbio na homeostase dos hormônios que atuam de forma integrada no desenvolvimento inicial das plântulas, entre eles, as auxinas, as citocininas, o ABA, o etileno e as giberelinas (Depuydt e Hardtke 2011; Ubeda-Tomás et al. 2012).

As alterações evidenciadas são típicas de respostas bioquímicas e morfológicas orquestradas pelas auxinas em resposta a um estresse abiótico, entre elas inibição no alongamento das raízes primárias (Casimiro et al. 2003; De Smet et al. 2006; Potters et al. 2007), com aumento na formação de raízes laterais em seus primórdios (Benková et al. 2003) e em sua emergência (Laskowski et al. 2006). As auxinas também estão envolvidas no desenvolvimento de raízes adventícias em monocotiledôneas (Da-Xi et al. 2003; Pacurar et al. 2014).

Diversos estudos sugerem uma ligação entre a ação das auxinas e a produção de EROs na tolerância das plantas ao estresse, embora os mecanismos exatos não sejam totalmente conhecidos (Krishnamurthy e Rathinasabapathi 2013; Bielach et al. 2017).

Tem sido relatado que uma das formas pelas quais as auxinas regulam a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é aumentando a expressão de enzimas que produzem superóxidos, como a NAPDH oxidase e a superóxido oxidase e, também, reduzindo a expressão de enzimas antioxidantes como a catalase e a ascorbato oxidase (Iglesias et al. 2010; Krishnamurthy e Rathinasabapathi 2013). Estes dados são consistentes com as alterações evidenciadas no presente trabalho, com relação à atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante, particularmente na *I. grandifolia*.

Parece haver, portanto, fortes indícios de que as alterações evidenciadas na morfologia das plântulas e nas enzimas do sistema de defesa antioxidante das plântulas tratadas com a F. But. de *U. ruziziensis* ou a protodioscina foram respostas à uma condição de estresse induzidas por EROs e que envolveram ações mediadas por hormônios como as auxinas. Os resultados sugeriram também uma participação do etileno, já que este hormônio exerce um papel central na formação dos aerênquimas. A mediação do etileno na formação de aerênquimas em raízes de plantas submetidas ao estresse por alagamento já é bem estabelecido e ocorre com aumento dos níveis de superóxidos e peróxido de

hidrogênio. Tem sido sugerido que as EROs estariam envolvidas na degeneração das células do córtex onde os aerênquimas são formados (Bouranis et al. 2003). As EROs seriam, também, responsáveis pelo aumento da atividade de peroxidases e também da lignificação, que ocorre na exoderme, no esclerênquima e na endoderme das raízes (Bouranis et al. 2003; Quan et al. 2008). No presente trabalho, foram encontradas fortes evidências de que muitos desses eventos ocorreram nas raízes de *I. grandifolia* tratadas com a F. But. de *U. ruziziensis* ou a protodioscina.

Em *D. insularis* as alterações morfológicas, anatômicas e bioquímicas causadas tanto pela F. But. de *U. ruziziensis* como pela protodioscina foram menos acentuadas se comparadas com as observadas na *I. grandifolia*, excetuando os efeitos sobre a germinação e o desenvolvimento inicial. A *D. insularis* parece ter sido capaz de anular com mais eficiência os efeitos deletérios de ambos os tratamentos, possivelmente devido às estruturas diferenciadas de suas raízes em relação às das dicotiledôneas, bem como à maior capacidade de seu sistema de defesa antioxidante.

### CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados do presente trabalho juntamente com os dados da literatura permite sugerir que as alterações induzidas pela F. But. de *U. ruziziensis* e também pela protodioscina nas plantas daninhas *I. grandifolia* e *D. insularis* foram respostas celulares adaptativas a uma condição de estresse e que foram orquestradas por hormônios, provavelmente auxinas e etileno, tendo os EROs como sinalizadores moleculares e também como indutores de danos oxidativos. Em geral, a planta daninha monocotiledônea *D. insularis* exibiu menor sensibilidade que a dicotiledônea *I. grandifolia*. A comparação das alterações causadas pela F. But. de *U. ruziziensis* com as da protodioscina revelou que a protodioscina deve ser um dos principais responsáveis pela atividade da F. But. de *U. ruziziensis*, uma vez que houve similaridade nas ações tanto na *I. grandifolia* como na *D. insularis*.

### REFERÊNCIAS

- Abraham D, Francischini AC, Pergo EM, et al (2003) Effects of  $\alpha$ -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. *Plant Physiol Biochem* 41:985–991. doi: 10.1016/j.plaphy.2003.07.003
- Aebi H (1984) [13] Catalase in Vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126. doi: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Azania AAPM, Azania CAM, Pavani MCMD, Cunha MCS (2003) Dormancy Breaking Methods in *Ipomoea* and *Merremia* Seeds. *Planta Daninha* 203–209
- Babcock GT (1999) How oxygen is activated and reduced in respiration. *Proc Natl Acad Sci* 96:12971–12973. doi: 10.1073/pnas.96.23.12971
- Baker CJ, Orlandi EW (1995) Active Oxygen in Plant Pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 33:299–321. doi: 10.1146/annurev.py.33.090195.001503
- Baziramakenga R, Leroux GD, Simard RR (1995) Effects of benzoic and cinnamic acids on

- membrane permeability of soybean roots. *J Chem Ecol* 21:1271–1285. doi: 10.1007/BF02027561
- Bendall DS, Bonner WD (1971) Cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. *Plant Physiol* 47:236–45. doi: 10.1104/pp.47.2.236
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, et al (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115:591–602. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00924-3
- Berlyn GP, Miksche JP (1976) Botanical microtechnique and cytochemistry. Iowa State University Press
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H (2013) Environmental regulation of dormancy and germination. In: *Seeds*. Springer New York, pp 299–339
- Bielach A, Hrtyan M, Tognetti VB (2017) Plants under stress: Involvement of auxin and cytokinin. *Int. J. Mol. Sci.* 18:1427
- Blokhina O, Fagerstedt KV (2010) Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: Origin and redundant regulatory systems. *Physiol. Plant.* 138:447–462
- Bond WJ, Midgley JJ (2003) The evolutionary ecology of sprouting in woody plants. *Int J Plant Sci* 164:S103–S114. doi: 10.1086/374191
- Bouranis DL, Chorianopoulou SN, Siyiannis VF, et al (2003) Aerenchyma formation in roots of maize during sulphate starvation. *Planta* 217:382–391. doi: 10.1007/s00425-003-1007-6
- Boveris A, Cadenas E, Chance B (1980) Low-level chemi-luminescence of the lipoxygenase reaction. *Photobiochem Photobiophys* 175–182
- Bracht A, Ishii-Iwamoto EL (2003) Métodos de laboratório em bioquímica. Manole
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2015) Biochemistry & molecular biology of plants
- Burgos NR, Talbert RE, Kim KS, Kuk YI (2004) Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*). *J Chem Ecol* 30:671–689. doi: 10.1023/B:JOEC.0000018637.94002.ba
- Casimiro I, Beeckman T, Graham N, et al (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci* 8:165–171. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00051-7
- Chiapusio G, Sánchez AM, Reigosa MJ, et al (1997) Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process? *J Chem Ecol* 23:2445–2453. doi: 10.1023/B:JOEC.0000006658.27633.15
- Christoffoleti PJ, López-Ovejero R (2003) Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. *Planta Daninha* 21:507–515. doi: 10.1590/S0100-83582003000300020

- Clayton W, Vorontsova MS, Harman K, Williamson H (2006) GrassBase - The Online World Grass Flora. Bot Gard Kew 4–5. doi: <http://www.kew.org/data/grasses-db/www/gen00390.htm>
- Colmer TD (2003) Long-distance transport of gases in plants: A perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant, Cell Environ.* 26:17–36
- Cutler DF, Botha T, Stevenson DW (2009) Anatomia vegetal : uma abordagem aplicada
- Da-Xi Z, Ke Y, Zhi-Hong X, Hong-Wei X (2003) Effect of polar auxin transport on rice root development. *Acta Bot Sin* 45:1421–1427
- De Smet I, Vanneste S, Inzé D, Beeckman T (2006) Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Mol. Biol.* 60:871–887
- Depuydt S, Hardtke CS (2011) Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* 21
- Díaz-Tielas C, Graña E, Sotelo T, et al (2012) The natural compound trans-chalcone induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant, Cell Environ* 35:1500–1517. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02506.x
- Duke SO (1986) Naturally occurring chemical compounds as herbicides. *Rev weed Sci* 2:15–44
- Estabrook RW (1967) Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods Enzymol* 10:41–47. doi: 10.1016/0076-6879(67)10010-4
- Foyer CH (1997) Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. *Oxidative Stress Mol Biol Antioxid Defenses* 587–621
- Foyer CH, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133:21–25. doi: 10.1007/BF00386001
- Foyer CH, Harbinson J, Mullineaux PM (1994) Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. CRC Press Boca Raton, FL 1–42
- Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K (2002) The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr* 88:587. doi: 10.1079/BJN2002725
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59:309–314. doi: 10.1104/pp.59.2.309
- Hara S, et al (2006) Thioredoxin-h1 reduces and reactivates the oxidized cytosolic malate dehydrogenase dimer in higher plants. *Journal of Biological Chemistry* 43:32065-3207.
- Heap I (2014) Herbicide resistant weeds. In: *Integrated Pest Management: Pesticide Problems*, Vol.3. pp 281–301
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* 125:189–198. doi: 10.1016/0003-9861(68)90654-1
- Hirata ACS, Hirata EK, Monquero PA, et al (2009) Plantas de cobertura no controle de plantas daninhas na cultura do tomate em plantio direto. *Planta Daninha* 27:465–472. doi:

10.1590/S0100-83582009000300006

- Holm L, Doll J, Holm E, et al (1997) World weeds: Natural histories and distribution. 1152
- Iglesias MJ, Terrile MC, Bartoli CG, et al (2010) Auxin signaling participates in the adaptative response against oxidative stress and salinity by interacting with redox metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 74:215–222. doi: 10.1007/s11103-010-9667-7
- Ishii-Iwamoto EL, Abraham D, Sert MA, et al (2006) Mitochondria as a site of allelochemical action. In: Reigosa MJ, Pedrol N, González L (eds) *Allelopathy: A physiological process with ecological implications*, 1st edn. Springer Science, Netherlands, pp 267–284
- Ishii-iwamoto EL, Marusa É, Coelho P, et al (2012) Effects of monoterpenes on physiological processes during seed germination and seedling growth. *Curr Bioact Compd* 8:50–64. doi: 10.2174/157340712799828223
- Kappus H (1985) Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. In: *Oxidative Stress*. pp 273–310
- Kissman GK, Groth D (1997) Plantas daninhas e nocivas. BASF Bras São Bernardo do Campo
- Kissmann K (1996) Adjuvantes para caldas de defensivos agrícolas
- Krishnamurthy A, Rathinasabapathi B (2013) Oxidative stress tolerance in plants. *Plant Signal Behav* 8:e25761. doi: 10.4161/psb.25761
- Labouriau LG, Osborn JH (1984) Temperature dependence of the germination of tomato seeds. *J Therm Biol* 9:285–294. doi: 10.1016/0306-4565(84)90010-X
- Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:251–275. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.251
- Larkin P (1987) Calmodulin levels are not responsible for aluminium tolerance in wheat. *Aust J Plant Physiol* 14:377. doi: 10.1071/PP9870377
- Laskowski M, Biller S, Stanley K, et al (2006) Expression profiling of auxin-treated *Arabidopsis* roots: Toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant Cell Physiol* 47:788–792. doi: 10.1093/pcp/pcj043
- Lorenzi H (2000) Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. *Plantarum* 3:608
- Machado M, Meira R, Santos LT, Ferreira F (2008) Caracterização anatômica de folha, colmo e rizoma de *Digitaria insularis*. *Planta Daninha* 26:1–8. doi: 10.1590/S0100-83582008000100001
- Maness PC, Smolinski S, Blake DM, et al (1999) Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: Toward an understanding of its killing mechanism. *Appl Environ Microbiol* 65:4094–4098. doi: 10.1111/j.1574-6968.1985.tb00864.x
- Maniou F, Chorianopoulou SN, Bouranis DL (2014) New insights into trophic aerenchyma formation strategy in maize (*Zea mays* L.) organs during sulfate deprivation. *Front Plant Sci* 5:581. doi: 10.3389/fpls.2014.00581

- Martin AC (1946) The comparative internal morphology of seeds. *Am Midl Nat* 36:513–660. doi: 10.2307/2421457
- Mito MS (2014) Estudo do mecanismo de ação fitotóxica da saponina esteroidal Protodioscina, identificada na palhada de *Brachiaria ruziziensis*, sobre a planta daninha *Bidens pilosa* L. 2014. p.67. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular). Universidade Estadual de Maringá, 2014.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9
- Mittler R, Berkowitz G (2001) Hydrogen peroxide, a messenger with too many roles? *Redox Rep* 6:69–72. doi: 10.1179/135100001101536067
- Mondo VHV, Carvalho SJP De, Dias ACR (2010) Efeitos da luz e temperatura na germinação de sementes de quatro espécies de plantas daninhas do gênero *Digitaria*. *Rev Bras Sementes* 32:131–137. doi: 10.1590/S0101-31222010000100015
- Moore AL, Siedow JN (1991) The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1059:121–140. doi: 10.1016/S0005-2728(05)80197-5
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867–880. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232
- Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP (2007) Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol Plant* 129:185–195. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00777.x
- Nicholls DG, Ferguson SJ (2013) Respiratory chains. In: *Bioenergetics*, 4th edn. Academic Press, pp 91–157
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:249–279. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.249
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368–373. doi: 10.1007/BF01248568
- Oliveira Jr RS, Rios FA, Constantin J, et al (2014) Grass straw mulching to suppress emergence and early growth of weeds. *Planta Daninha* 32:11–17. doi: 10.1590/S0100-83582014000100002
- Pacurar DI, Perrone I, Bellini C (2014) Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. *Physiol. Plant.* 151:83–96
- Parrish DJ, Leopold AC (1978) Confounding of alternate respiration by lipoxygenase activity. *Plant Physiol* 62:470–2. doi: 10.1104/PP.62.3.470
- Pergo EM, Barbosa MC, Mito MS, et al (2017) The activity of the antioxidant defense system

- of the weed species *Senna obtusifolia* L. and its resistance to allelochemical Stress. *J Chem Ecol* 43:725–738. doi: 10.1007/s10886-017-0865-5
- Pergo EM, Ishii-Iwamoto EL (2011) Changes in energy metabolism and antioxidant defense systems during seed germination of the weed species *Ipomoea triloba* L. and the responses to allelochemicals. *J Chem Ecol* 37:500–513. doi: 10.1007/s10886-011-9945-0
- Podolak I, Galanty A, Sobolewska D (2010) Saponins as cytotoxic agents: A review. *Phytochem. Rev.* 9:425–474
- Popov VN, Simonian RA, Skulachev VP, Starkov AA (1997) Inhibition of the alternative oxidase stimulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in plant mitochondria. *FEBS Lett* 415:87–90. doi: 10.1016/S0014-5793(97)01099-5
- Porta H, Rocha-Sosa M, Slusarenko A, Ryan C (2002) Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiol* 130:15–21. doi: 10.1104/pp.010787
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, et al (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci* 12:98–105. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2007.01.004
- Powles SB, Yu Q (2010) Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annu Rev Plant Biol* 61:317–347. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112119
- Pütter J (1974) Peroxidases. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Elsevier, pp 685–690
- Quan LJ, Zhang B, Shi WW, Li HY (2008) Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Integr. Plant Biol.* 50:2–18
- Queiroz O (1969) Photoperiodisme et activite enzymatique (PEP carboxylase et enzyme malique) dans les feuilles de *Kalanchoe blossfeldiana*. *Phytochemistry* 8:1655–1663. doi: 10.1016/S0031-9422(00)85950-6
- Rasmusson AG, Fernie AR, van Dongen JT (2009) Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? *Physiol Plant* 137:371–382. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01252.x
- Recknagel R, Glenden E (1984) *Oxygen radicals in biological systems*. Acad Press New York
- Rizzardi MA, Roman ES, Borowski DZ, Marcon R (2004) Interferência de populações de *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea ramosissima* isoladas ou em misturas sobre a cultura de soja. *Planta Daninha* 22:29–34. doi: 10.1590/S0100-83582004000100004
- Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* 101:7–12. doi: 10.1104/pp.101.1.7
- Scandalios JG (1974) Isozymes in development and differentiation. *Annu Rev Plant Physiol* 25:225–258. doi: 10.1146/annurev.pp.25.060174.001301
- Schulz M, Marocco A, Tabaglio V, et al (2013) Benzoxazinoids in rye allelopathy - from discovery to application in sustainable weed control and organic farming. *J Chem Ecol* 39:154–174. doi: 10.1007/s10886-013-0235-x
- Sharma P, Jha A, Dubey R (2010) Oxidative stress and antioxidative defense systems in plants

- growing under abiotic stresses. In: CRC Press, Taylor and Francis p 89–138
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot* 2012:1–26. doi: 10.1155/2012/217037
- Siedentopp U (2008) El regaliz, una planta medicinal eficaz para la tos y las afecciones de estómago. *Rev. Int. Acupunt.* 2:249–252
- Silva AA, et al (2014) Bioguided isolation and identification of the protodioscin isomers from *Brachiaria ruziziensis* as inhibitors of growth of the weed species *Euphorbia heterophylla*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Siyiannis VF, Protonotarios VE, Zechmann B, et al (2012) Comparative spatiotemporal analysis of root aerenchyma formation processes in maize due to sulphate, nitrate or phosphate deprivation. *Protoplasma* 249:671–686. doi: 10.1007/s00709-011-0309-y
- Skutnik M, Rychter AM (2009) Differential response of antioxidant systems in leaves and roots of barley subjected to anoxia and post-anoxia. *J Plant Physiol* 166:926–937. doi: 10.1016/J.JPLPH.2008.11.010
- Smirnoff N (1995) Antioxidant systems and plant response to the environment. In: *Environment and plant metabolism*. BIOS Sci. Publi., pp 217–241
- Sparg SG, Light ME, Van Staden J (2004) Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* 94:219–243
- Taiz L, Zeiger E (2010) *Plant Physiology*, Fifth Edition. Cell 1:782
- Teasdale JR, Mohler CL (2000) The quantitative relationship between weed emergence and the physical properties of mulches. *Weed Sci* 48:385–392. doi: 10.1614/0043-1745(2000)048[0385:TQRBWE]2.0.CO;2
- Thaler JS (1999) Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism of herbivores. *Nature* 399:686–688. doi: 10.1038/21420
- Tomkins DJ, Grant WF (1978) Morphological and genetic factors influencing the response of weed species to herbicides. *Can J Bot* 56:1466–1471. doi: 10.1139/b78-171
- Tripathy BC, Oelmüller R (2012) Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* 7:1621–1633
- Ubeda-Tomás S, Beemster GTS, Bennett MJ (2012) Hormonal regulation of root growth: Integrating local activities into global behaviour. *Trends Plant Sci.* 17:326–331
- Weston LA (1996) Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. In: *Agronomy Journal*. pp 860–866
- Xu FQ, Zhong HM, Liu HY, et al (2007) Steroidal saponins from *Lysimachia paridiformis*. *J Asian Nat Prod Res* 9:493–497. doi: 10.1080/10286020600727434

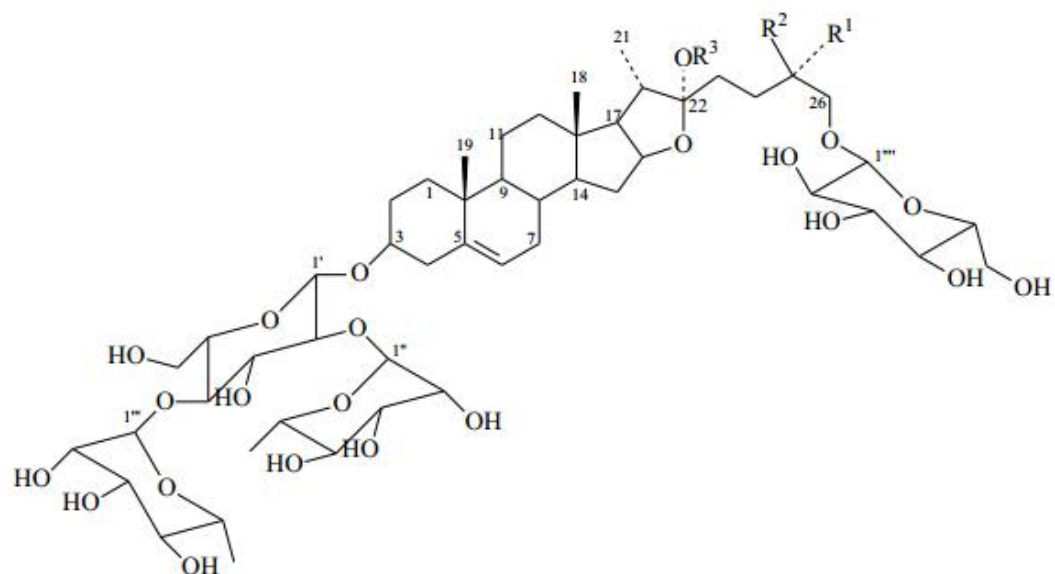


ANEXOS

**Tabela 1** Análise das porcentagens de germinação (%), índices de velocidade de germinação (IVG), velocidade de germinação acumulada (VGA) e tempos médios de germinação (TMG) de *I. grandifolia* e de *D. insularis* incubadas por 120 horas, em ágar 0,8%, e diferentes concentrações da F. But. de *U. ruziziensis* e da protodioscina.

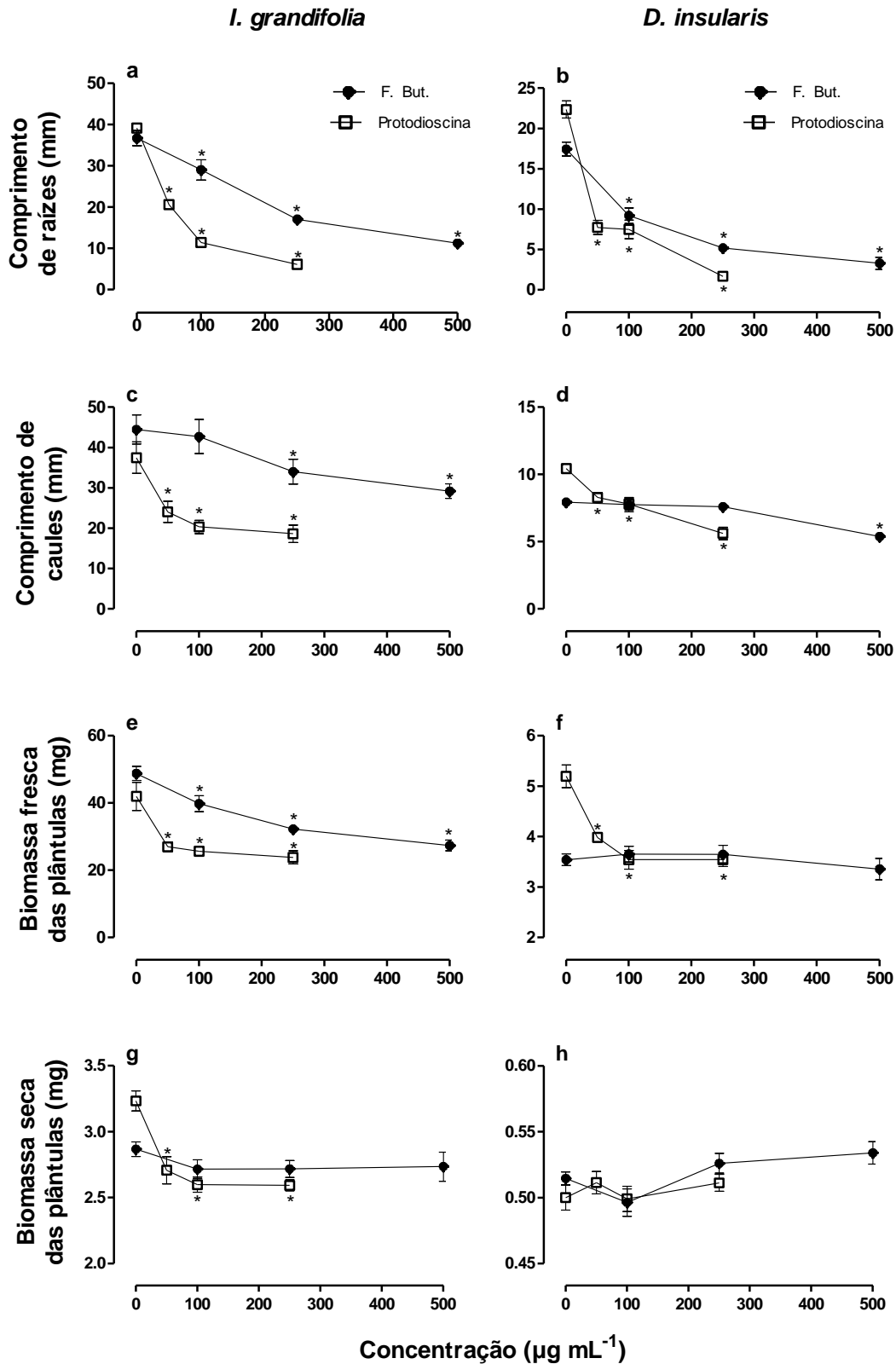
Planta daninha	Tratamento		% de germinação	IVG <sup>‡</sup>	VGA <sup>‡</sup>	TMG
<i>I. grandifolia</i>	F. But. ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0	80,40±1,47	0,78±0,01	3,64±0,03	29,01±0,72
		100	75,20±1,86	0,76±0,02	3,50±0,07	26,47±0,77
		250	82,00±1,41	0,86±0,02*	3,99±0,07*	26,89±0,86
		500	79,20±2,33	0,80±0,03	3,70±0,12	27,59±0,10
		0	81,20±1,62	0,73±0,01	3,47±0,06	31,14±0,83
	Protodioscina ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	50	75,20±3,01	0,66±0,02	3,18±0,11	32,23±0,99
		100	82,00±3,69	0,73±0,03	3,53±0,15	30,88±0,89
		250	75,20±4,03	0,68±0,03	3,23±0,15	30,70±1,03
		0	68,40±4,91	0,20±0,02	1,39±0,10	65,54±2,12
		F. But. ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	100	52,40±4,58*	0,13±0,02*	1,07±0,12*
250	48,80±0,80*		0,12±0,00*	0,98±0,03*	66,08±1,27	
500	39,20±3,32*		0,08±0,01*	0,60±0,05*	79,03±1,28*	
0	65,60±7,25		0,18±0,02	1,47±0,15	60,83±0,52	
Protodioscina ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	50		55,20±4,59	0,15±0,01	1,16±0,09	63,88±1,52
	100	65,20±3,14	0,17±0,01	1,26±0,10	68,29±1,87	
	250	36,00±2,45*	0,09±0,01*	0,63±0,04*	74,17±4,50*	

Tabela 1. <sup>‡</sup>Sementes germinadas por hora. Os valores são expressos como média ± EP (n=5). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre o tratamento e o seu respectivo controle na coluna, de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $P < 0,05$ ).

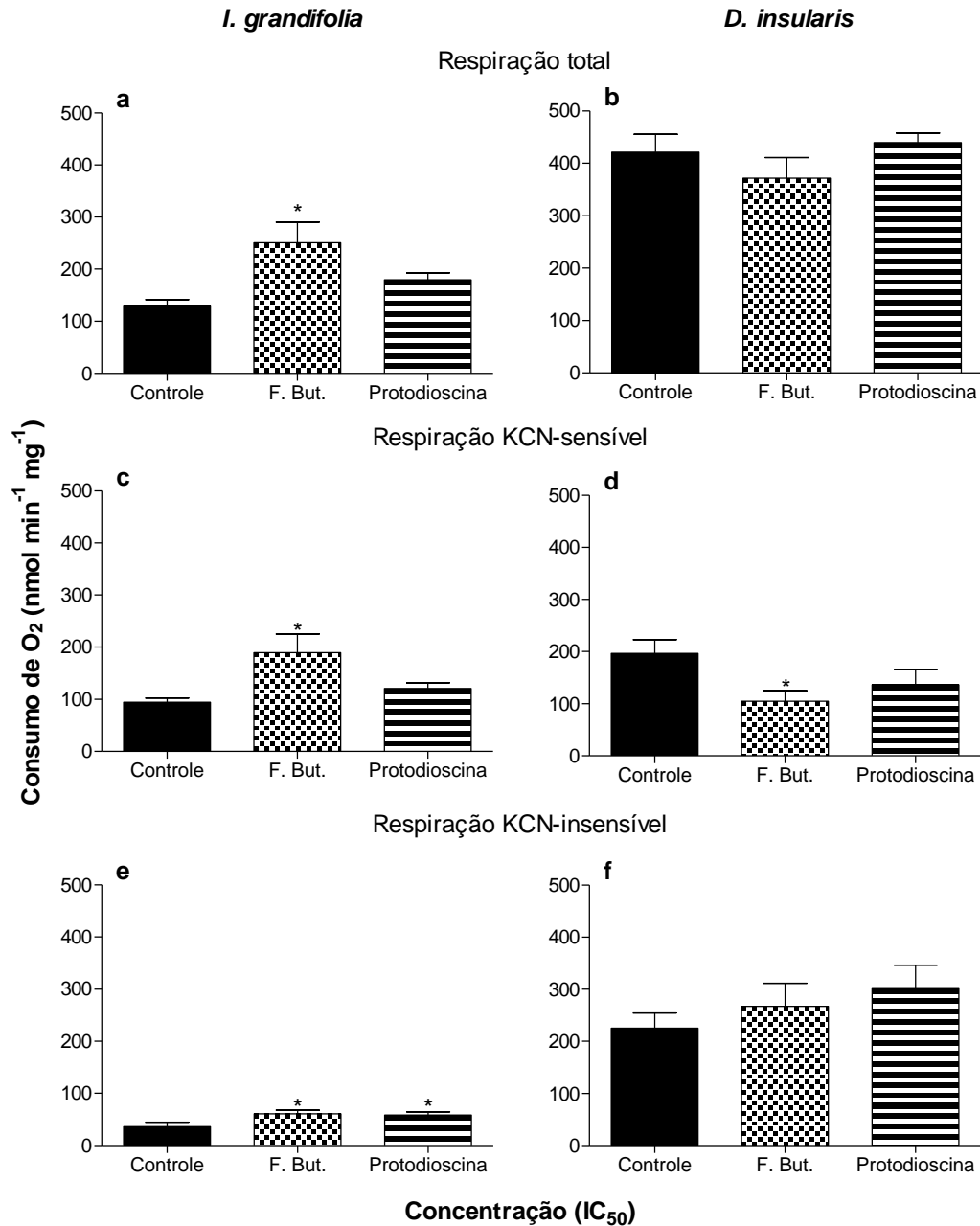


	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
<b>a:</b>	CH <sub>3</sub>	H	H
<b>b:</b>	H	CH <sub>3</sub>	H
<b>c:</b>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
<b>d:</b>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

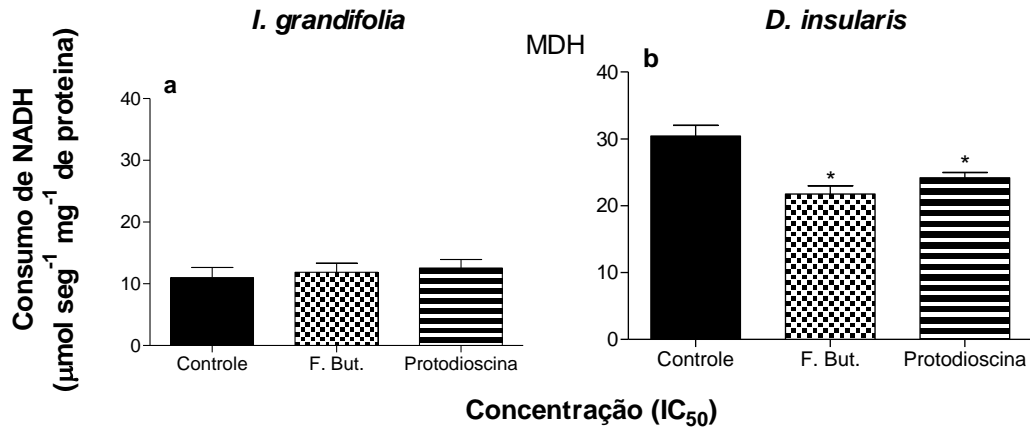
**Fig. 1** Estruturas químicas dos isômeros de protodioscina identificados na F. But. de *U. ruzizensis*. (a) Protoneodioscina, (b) Protodioscina, (c) Metilprotoneodioscina e (d) Metilprotodioscina.



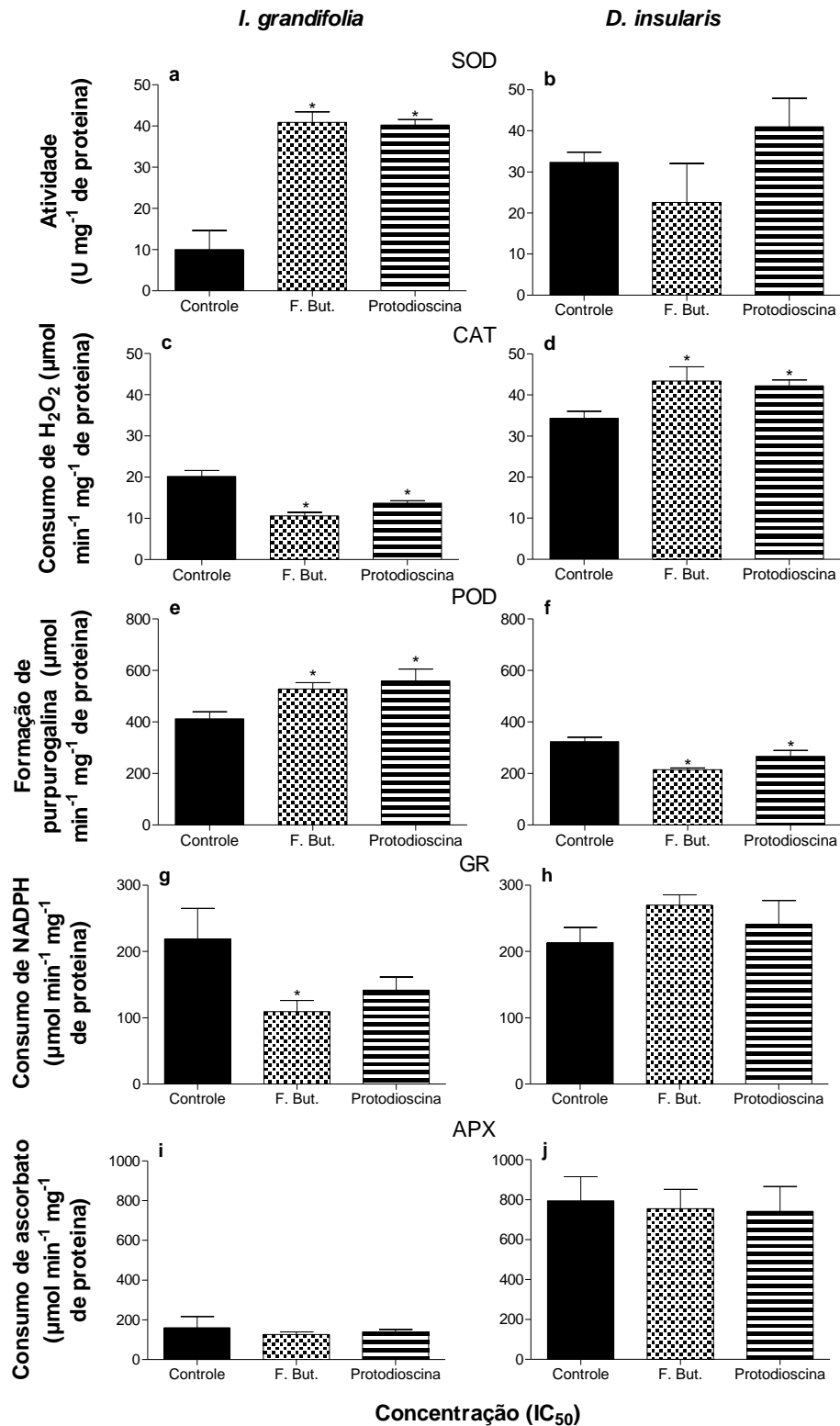
**Fig. 2** Efeitos das diferentes concentrações de F. But. de *U. ruziziensis* e da protodioscina sobre os comprimentos das raízes (a, b), comprimentos dos caules (c, d), biomassas frescas das plântulas (e, f) e biomassas secas das plântulas (g, h) de *I. grandifolia* e de *D. insularis*, respectivamente, incubadas por 120 horas. Os valores são as médias ± EP (n=5). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e o seu respectivo controle de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $P < 0,05$ ).



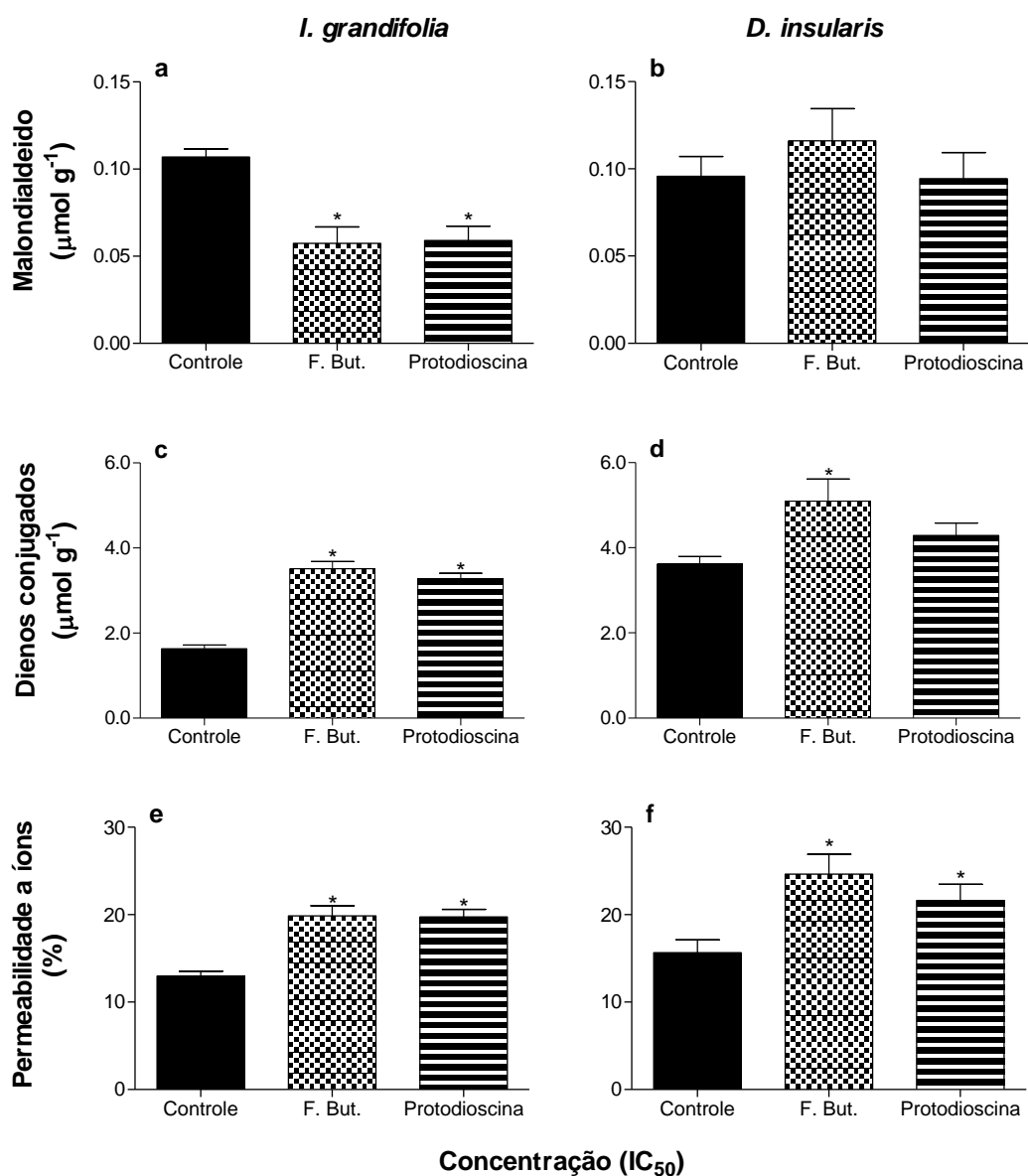
**Fig. 3** Efeitos da F. But. de *U. ruziziensis* e da protodioscina sobre a atividade respiratória dos ápices de raízes de *I. grandifolia* e de *D. insularis* incubadas por 120 horas. As concentrações utilizadas de F. But. de *U. ruziziensis* e da protodioscina foram as IC<sub>50</sub>: 230 e 54 µg mL<sup>-1</sup> para *I. grandifolia*, e 108 e 34 µg mL<sup>-1</sup> para *D. insularis*, respectivamente. Amostras dos ápices de raízes foram removidas e imediatamente adicionadas a uma câmara de incubação contendo 2 mL de meio nutritivo na ausência ou na presença de 250 µM de KCN. O consumo de oxigênio foi seguido polarograficamente por aproximadamente 12-15 minutos. Respiração total - taxa de consumo de oxigênio na ausência de KCN (a, b), KCN-sensível - diferença entre o consumo de oxigênio medido na ausência e na presença de KCN (c, d) e KCN-insensível - respiração após adição de KCN (e, f). Os valores são expressos como média ± EP (n=6-7). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e o seu respectivo controle de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $P < 0,05$ ).



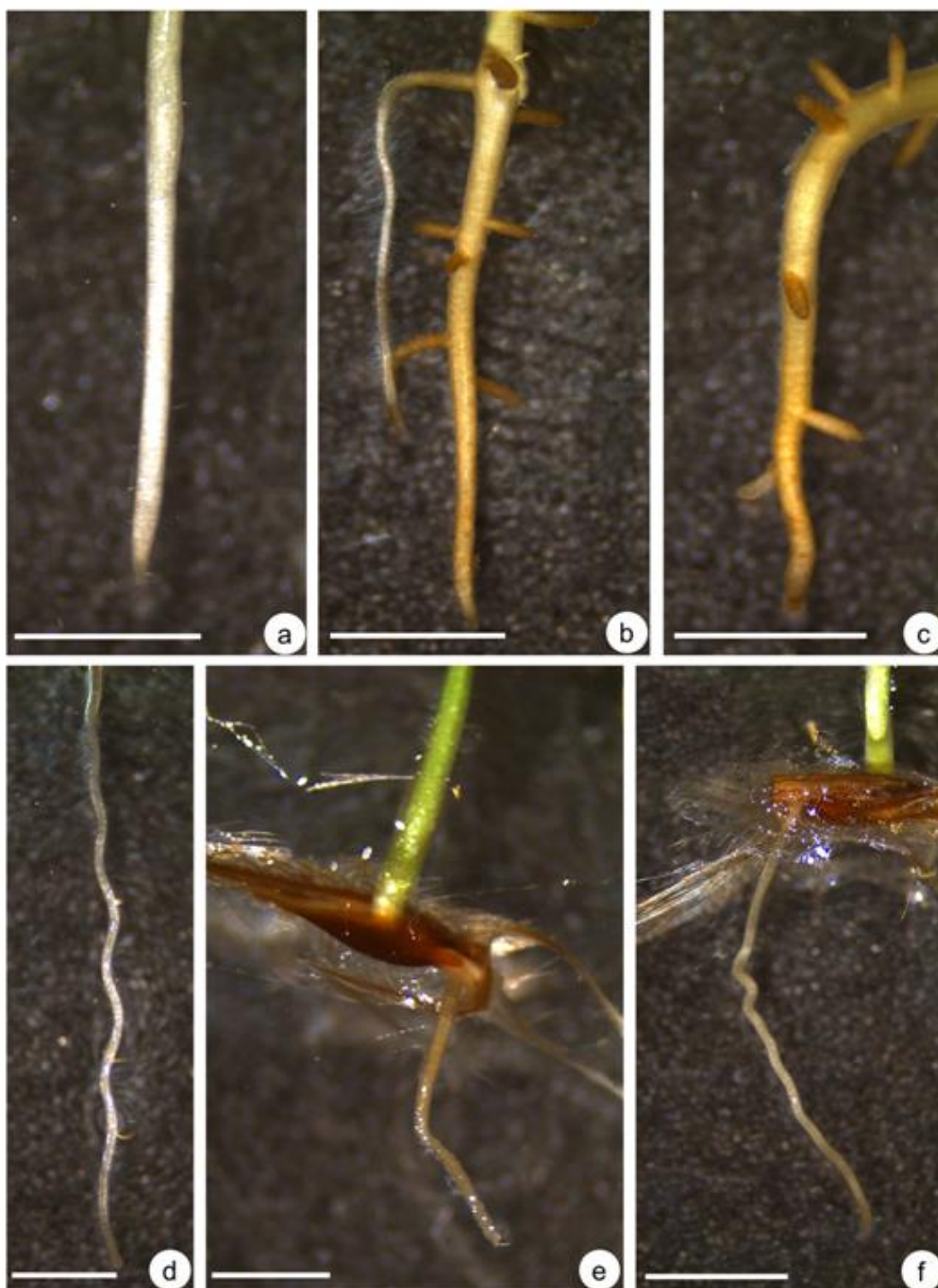
**Fig. 4** Efeitos da F. But. de *U. ruzizensis* e da protodioscina sobre a atividade da enzima malato desidrogenase (a, b) das raízes de plântulas de *I. grandifolia* e de *D. insularis* incubadas por 120 horas. As concentrações utilizadas de F. But. de *U. ruzizensis* e da protodioscina foram as  $\text{IC}_{50}$ : 230 e 54  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *I. grandifolia*, e 108 e 34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *D. insularis*, respectivamente. Os valores são expressos como média  $\pm$  EP (n=6-7). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e o seu respectivo controle de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $P < 0,05$ ).



**Fig. 5** Efeitos da F. But. de *U. ruziziensis* e da protodioscina sobre a atividade das enzimas do sistema antioxidante de raízes de plântulas de *I. grandifolia* e de *D. insularis* incubadas por 120 horas. As concentrações utilizadas de F. But. de *U. ruziziensis* e da protodioscina foram as IC<sub>50</sub>: 230 e 54 μg mL<sup>-1</sup> para *I. grandifolia*, e 108 e 34 μg mL<sup>-1</sup> para *D. insularis*, respectivamente. Superóxido dismutase (SOD) (a, b), Catalase (CAT) (c, d), peroxidases (POD) (e, f), glutationa redutase (GR) (g, h) e ascorbato peroxidase (APX) (i, j). Os valores são expressos como média ± EP (n=6-7). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e o seu respectivo controle de acordo com ANOVA e teste de Duncan ( $P < 0,05$ ).

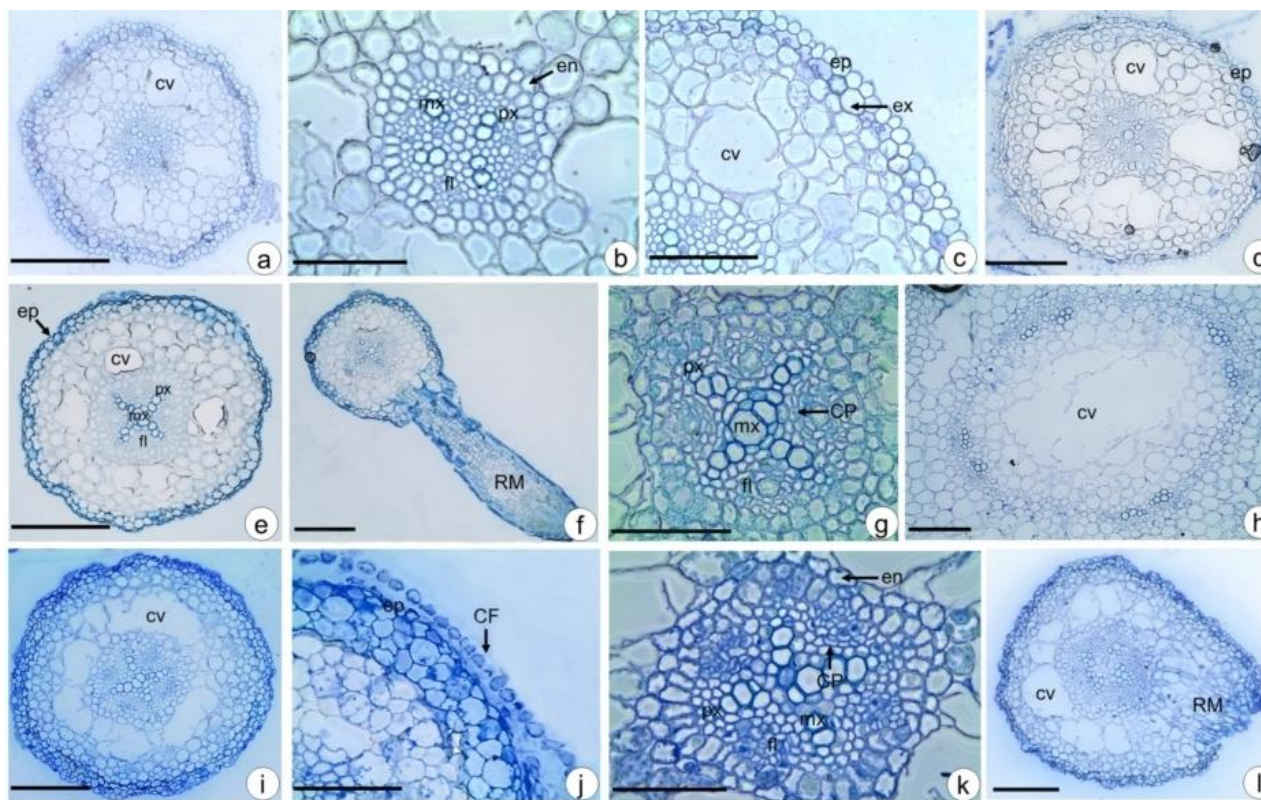


**Fig. 6** Efeitos da F. But. de *U. ruziziensis* e da protodioscina sobre o conteúdo de malondialdeído – MDA (a, b), conteúdo de dienos conjugados (c, d) e permeabilidade das raízes aos íons (e, f) de *I. grandifolia* e de *D. insularis* incubadas por 120 horas. As concentrações utilizadas de F. But. de *U. ruziziensis* e da protodioscina foram as  $\text{IC}_{50}$ : 230 e 54  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *I. grandifolia*, e 108 e 34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *D. insularis*, respectivamente. Os valores são expressos como média  $\pm$  EP (n=5). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os tratamentos e o seu respectivo controle de acordo com ANOVA e teste de *Duncan* ( $P < 0,05$ ).

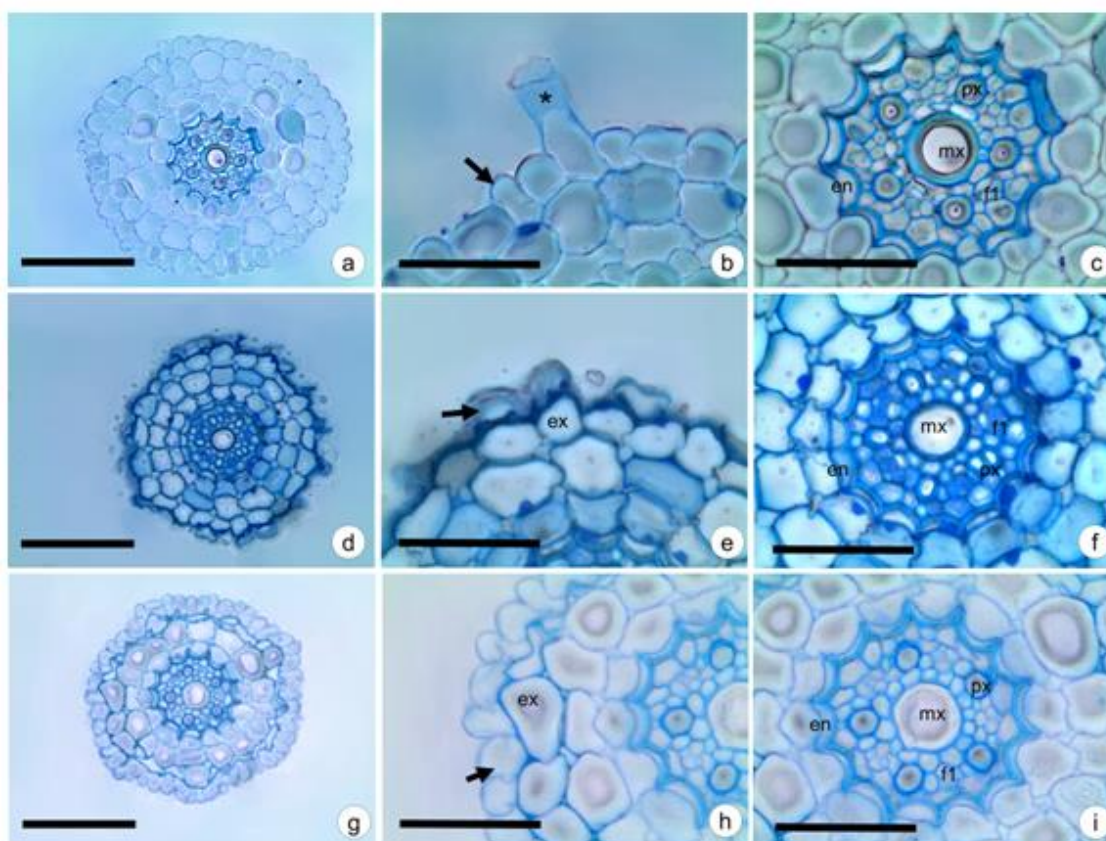


**Fig. 7** Morfologia das raízes primárias de *I. grandifolia* (a - c), e das raízes adventícias de *D. insularis* (d - f) incubadas por 120 horas. As concentrações utilizadas de F. But. de *U. ruziziensis* e da protodioscina foram as IC<sub>50</sub>: 230 e 54  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *I. grandifolia*, e 108 e 34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *D. insularis*, respectivamente. Controle (3mm) (a), F. But. de *U. ruziziensis* em IC<sub>50</sub> (3mm) (b), protodioscina em IC<sub>50</sub> (3mm) (c), controle (3mm) (d), F. But. de *U. ruziziensis* em IC<sub>50</sub> (2 mm) (e) e protodioscina em IC<sub>50</sub> (3mm) (f).





**Fig. 8** Pormenor anatômico da raiz primária de *I. grandifolia*. (a - d = Controle): vista geral da região média da raiz, evidenciando as cavidades e a organização dos tecidos radiculares (200 $\mu$ m) (a), detalhe da raiz tetrarca (100 $\mu$ m) (b), detalhe da epiderme e formação da cavidade (100 $\mu$ m) (c) e base, evidenciando a epiderme comprimida, o aumento das cavidades e dos demais tecidos (200 $\mu$ m) (d). (e - h = F. But. de *U. ruziziensis* em IC<sub>50</sub>): vista geral da região média da raiz, evidenciando as cavidades e a organização dos tecidos radiculares (200 $\mu$ m) (e), ramificação próxima à região apical (200 $\mu$ m) (f), detalhe destacando xilema e floema com tubo crivado grande em evidência e a origem de câmbio procambial (100 $\mu$ m) (g) e detalhe evidenciando a cavidade central na base da raiz (100 $\mu$ m) (h). (i - l = Protodioscina em IC<sub>50</sub>): vista geral da região média da raiz, evidenciando as cavidades e a organização dos tecidos radiculares (200 $\mu$ m) (i), detalhe da epiderme da região média da raiz com células da coifa (100 $\mu$ m) (j), detalhe dos tecidos vasculares, evidenciando a origem do câmbio procambial (100 $\mu$ m) (k) e vista geral da base destacando a presença de cavidades maiores, aumento dos tecidos secundários e a presença de ramificação (200 $\mu$ m) (l). As concentrações utilizadas de F. But. de *U. ruziziensis* e da protodioscina foram as IC<sub>50</sub>: 230 e 54  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> para *I. grandifolia*, e 108 e 34  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> para *D. insularis*, respectivamente. (CV: cavidade; mx: metaxilema; px: protoxilema; fl: floema; en: endoderme; ex: exoderme; ep: epiderme; cf: coifa; cp: cambio procambial; rm: ramificação).



**Fig. 9** Pormenor anatômico da raiz adventícia de *D. insularis*. (a - c = Controle): vista geral da raiz, evidenciando a organização dos tecidos radiculares (100  $\mu\text{m}$ ) (a), epiderme com tricomas unicelulares (50  $\mu\text{m}$ ) (b) e cilindro central (50  $\mu\text{m}$ ) (c). (d - f = F. But. de *U. ruziziensis* em  $\text{IC}_{50}$ ): vista geral da raiz, evidenciando a organização dos tecidos radiculares (100  $\mu\text{m}$ ) (d), epiderme descontínua e exoderme com espessamento parietal (50  $\mu\text{m}$ ) (e) e cilindro central (50  $\mu\text{m}$ ) (f). (g - i = Protodioscina em  $\text{IC}_{50}$ ): vista geral da raiz, evidenciando a organização dos tecidos radiculares (100  $\mu\text{m}$ ) (g), exoderme com espessamento parietal (50  $\mu\text{m}$ ) (h) e cilindro central (50  $\mu\text{m}$ ) (i). As concentrações utilizadas de F. But. de *U. ruziziensis* e da protodioscina foram as  $\text{IC}_{50}$ : 230 e 54  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *I. grandifolia*, e 108 e 34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *D. insularis*, respectivamente. (Seta: epiderme; \*: tricoma; en: endoderme; ex: exoderme; fl: floema primário; mx: metaxilema; px: protoxilema).