

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM SEMENTES E METABOLISMO ANTIOXIDATIVO DE PLÂNTULAS DE ALFACE EXPOSTAS À AÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Zantedeschia aethiopica* Spreng.

Tiago Zanatta Aumonde, Emanuela Garbin Martinazzo, Junior Borella, Tiago Pedó, Luciano do Amarante, Francisco Amaral Villela e Dario Munt de Moraes

RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar a influência de concentrações do extrato de *Zantedeschia aethiopica* Spreng. sobre o desempenho fisiológico de sementes e da resposta do metabolismo antioxidativo de plântulas de alface. Os tratamentos consistiram em extratos de folhas de *Z. aethiopica* nas concentrações 0; 6; 12; 25 e 50%. Foram avaliados germinação, primeira contagem de germinação, índice e velocidade de germinação, comprimento de parte aérea e de radícula, massa seca total de plântulas, teores de clorofila, atividade das enzimas superóxido-dismutase, catalase e ascorbato peroxidase, peroxidação lipídica, quantificação de peróxido de hidrogênio e emergência de plântulas, comprimento de órgãos e massa seca total das plântulas emergidas. A porcentagem de germinação, o compri-

mento de parte aérea e de radícula de plântulas germinadas e a massa seca total de plântulas emergidas em casa de vegetação foram reduzidos com a elevação da concentração do extrato. Houve aumento da condutividade elétrica, da atividade das enzimas superóxido-dismutase, catalase e ascorbato peroxidase, da quantidade de peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica em plântulas com o incremento da concentração do extrato. O extrato reduziu a qualidade fisiológica das sementes de alface e induziu o aumento na produção de peróxido de hidrogênio em plântulas, o que elevou a atividade das enzimas antioxidativas que não foram eficientes na detoxificação dos tecidos, resultando em dano celular e aumento da incidência de plântulas anormais.

Introdução

A espécie *Zantedeschia aethiopica* Spreng., conhecida popularmente como copo-de-leite, pertence a família Araceae e é cultivada com fins ornamentais. Este gênero produz compostos aromáticos lignóides como o pironesinol, havendo conhecimento também da presença de flavonóides do tipo flavonol (quercetina) e flavona, além da presença de drusas de oxalato de cálcio (Greca *et al.*, 1998), substâncias que tornam a espécie potencialmente fitotóxica.

As plantas possuem, por meio do metabolismo secundário, capacidade de produzir compostos conhecidos como

aleloquímicos, dotados de potencial de inibição ou estímulo da germinação e do crescimento inicial (Macías *et al.*, 2007). Estes sintomas constituem reflexos secundários da ação do aleloquímico, que ao inibir, danificar ou inativa vias do sistema metabólico da semente e da plântula, alterando a bicamada fosfolipídica e o sistema de membranas celulares, o comportamento celular, fitormonal ou o fotossintético (Rizvi *et al.*, 1992; Chou, 1999, 2006), processos nos quais estão envolvidas formas reativas de O₂.

Diversos trabalhos foram efetuados objetivando identificar compostos ou avaliar o efeito alelopático de extratos

sobre a germinação e o crescimento inicial de diversas espécies. Estudos alelopáticos envolvendo a avaliação da qualidade fisiológica de sementes, teor de pigmentos fotossintéticos e comportamento do metabolismo antioxidativo em plântulas são escassos. As enzimas superóxido-dismutase, peroxidases e catalases estão envolvidas na remoção de radicais livres durante o processo de deterioração de sementes (Rosa *et al.*, 2005) e a condições de estresse em plantas. A elucidação do metabolismo antioxidativo conjuntamente à determinação de pigmentos fotossintéticos e atributos de qualidade fisiológica, torna-se importante ferramenta em es-

tudos alelopáticos, pois permite a compreensão de respostas visuais da semente ou da plântula ao estresse imposto pelo extrato, fornecendo subsídios à descrição do seu mecanismo de ação. Conjuntamente, não há conhecimento sobre trabalhos envolvendo *Zantedeschia aethiopica* Spreng., sendo justificável tal tarefa pela importância dos compostos nela identificados, o cálcio envolvido na regulação de diversas vias metabólicas vegetais e os flavonóides, um dos principais grupos de aleloquímicos isolados (Kink e Ambika, 2002).

Neste contexto, este trabalho objetivou avaliar a influência de concentrações do extrato de *Z. aethiopica* sobre o desem-

PALAVRAS CHAVE / Crescimento Inicial / Enzimas / *Lactuca sativa* / Teores de Clorofila / Vigor /

Recebido: 16/02/2012. Modificado: 31/10/2012. Aceito: 02/11/2012.

Tiago Zanatta Aumonde. Engenheiro Agrônomo, M.Sc. e Doutorando em Ciência e Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Brasil. Endereço: UFPel/FAEM - Caixa Postal: 354-CEP: 96 001-970 - Pelotas, RS, Brasil. e-mail: tiago.aumonde@gmail.com

Emanuela Garbin Martinazzo. Bióloga e Doutora em Fisiologia Vegetal, UFPel, Brasil. Bolsista PNPd-CAPES, UFPel, Brasil.

Junior Borella. Biólogo e Doutorando em Fisiologia Vegetal, UFPel, Brasil.

Tiago Pedó. Engenheiro Agrônomo, M.Sc. e Doutorando em

Ciência e Tecnologia de Sementes, UFPel, Brasil.

Luciano do Amarante. Engenheiro Agrônomo e Doutor em Biologia Vegetal, Unicamp, Brasil. Professor, UFPel, Brasil.

Francisco Amaral Villela. Engenheiro Agrícola e Doutor em Fitotecnia, USP, Brasil. Professor, UFPel, Brasil.

Dario Munt de Moraes. Engenheiro Agrônomo e Doutor em Agronomia, USP, Brasil. Professor, UFPel, Brasil.

PHYSIOLOGICAL CHANGES IN SEEDS AND ANTIOXIDANT METABOLISM OF LETTUCE SEEDLING EXPOSED TO THE ACTION OF *Zantedeschia aethiopica* Spreng. LEAF EXTRACT

Tiago Zanatta Aumonde, Emanuela Garbin Martinazzo, Junior Borella, Tiago Pedó, Luciano do Amarante, Francisco Amaral Villela and Dario Munt de Moraes

SUMMARY

This work aimed to evaluate the influence of different concentrations of *Zantedeschia aethiopica* Spreng. extract on the physiological performance of the seed and on the response of the antioxidant metabolism of lettuce seedlings. The treatments consisted of leaves extracts from *Z. aethiopica* at concentrations of 0, 6, 12, 25 and 50%. Germination, first germination count, germination speed and index, length of shoot and radicle, seedling total dry mass, chlorophyll content, activity of superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase enzymes, lipid peroxidation, hydrogen peroxide quantification and seedling emergence, length of organs, and total dry mass of seedlings were evaluated. The percentage of germination,

the length of the shoot and radicle of seedlings and the total dry mass of seedlings grown in the greenhouse were reduced as the concentration of the extract increased. There were increases of electrical conductivity, of superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase enzymes and the amount of hydrogen peroxide and lipid peroxidation in seedlings with increasing extract concentration. The extract reduced the physiological quality of lettuce seeds and induced an increased production of hydrogen peroxide in seedlings, which increased the activity of antioxidant enzymes that were not effective in tissue detoxification, resulting in cellular damage and increased numbers of abnormal seedlings.

ALTERACIONES FISIOLÓGICAS EN SEMILLAS Y METABOLISMO ANTIOXIDATIVO DE PLÁNTULAS DE LECHUGA EXPUESTAS A LA ACCIÓN DE EXTRACTO DE HOJAS DE *Zantedeschia aethiopica* Spreng

Tiago Zanatta Aumonde, Emanuela Garbin Martinazzo, Junior Borella, Tiago Pedó, Luciano do Amarante, Francisco Amaral Villela y Dario Munt de Moraes

RESUMEN

Este trabajo tuvo por finalidad evaluar la influencia de la concentración de un extracto de *Zantedeschia aethiopica* Spreng. sobre el desempeño fisiológico de semillas y la respuesta del metabolismo antioxidante de plántulas de lechuga. Los tratamientos consistieron en extractos de hojas de *Z. aethiopica* en concentraciones de 0; 6; 12; 25 y 50%. Fue evaluada la germinación, el primer conteo de germinación, índice y velocidad de germinación, tamaño de la parte aérea y de la radícula, masa seca total de las plántulas, tenor de clorofila, actividad de las enzimas superóxido-dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa, y la peroxidación lipídica, y se cuantificó el peróxido de hidrógeno y la emergencia de plántulas, tamaño de órganos y masa seca total de las plántulas. El porcentaje de germinación, el tamaño de la parte aérea y de la radícula

de plántulas germinadas y la masa seca total de plántulas crecidas en invernadero disminuyeron con el aumento de la concentración del extracto. Hubo aumento de la conductividad eléctrica, de la actividad de las enzimas superóxido-dismutasa, catalasa y ascorbato-peroxidada, de la cantidad de peróxido de hidrógeno y de la peroxidación lipídica en plántulas ante el incremento de la concentración del extracto. El extracto redujo la calidad fisiológica de las semillas de lechuga e indujo aumento de la producción de peróxido de hidrógeno en las plántulas, lo que elevó la actividad de las enzimas antioxidantes, que no fueron eficientes en la detoxificación de los tejidos, resultando en daño celular y aumento de la incidencia de plántulas anormales.

penho fisiológico de sementes e na resposta do metabolismo antioxidativo de plântulas de alface.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Sementes, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Pelotas, situada em 31°52'S, 52°21'O e altitude de 13m.

O extrato concentrado de copo-de-leite (*Zantedeschia aethio-*

pica Spreng.) foi obtido a partir de folhas maduras completamente expandidas, dotadas de pecíolo e provenientes de plantas de meia sombra. As folhas, previamente lavadas em água destilada e secas com papel toalha, sofreram trituração e centrifugação em equipamento comercial e o extrato obtido considerado 100% concentrado foi armazenado em recipiente âmbar a temperatura de 10°C, em refrigerador. Após 24h, o extrato concentrado foi submetido à filtração simples e o filtrado armazenado em recipiente âmbar, sob refrigeração a 10°C.

Foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), cv. Mimosa Salad Bowl®, espécie alvo sensível a substâncias tóxicas, aleloquímicos e tolerante a ampla faixa de variação de pH e potencial osmótico (Rice, 1984). Os tratamentos foram compostos pelas concentrações 0, 6, 12, 25 e 50% do extrato de copo-de-leite. Cada 100ml do extrato nas concentrações de 0, 6, 12, 25 e 50% foram obtidos pela diluição de 0, 6, 12, 25 e 50ml de extrato concentrado em 94, 88, 75 e 50ml de água destilada (v/v). Os extratos nas diferentes concentra-

ções tiveram o pH aferido, atingindo 6,0 ± 0,1. Para avaliar o efeito das concentrações do referido extrato sobre a qualidade fisiológica de sementes e no metabolismo antioxidativo de plântulas foram realizados os seguintes testes:

Teste de germinação (%). Conduzido por meio de quatro amostras com quatro subamostras de 50 sementes, semeadas em caixas tipo gerbox, sobre duas folhas de papel mata-borrão umedecidas na proporção de 2,5 vezes a massa do papel, com as diferentes concentrações

do extrato. Após, os gerbox foram transferidos para câmara de germinação tipo BOD a 20°C e período luminoso de 12h, mantido por quatro lâmpadas brancas fluorescentes de 25W, tipo luz do dia. As avaliações foram efetuadas aos sete dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais (Brasil, 2009).

Primeira contagem da germinação (%). Realizada aos quatro dias após a semeadura, conjuntamente ao teste de germinação. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais (Brasil, 2009).

Velocidade de germinação (VG) e índice de velocidade de germinação (IVG). Obtidos a partir de contagens diárias das sementes germinadas (protrusão radicular mínima de 3-4mm). As contagens foram realizadas até a obtenção do número constante de sementes germinadas. A VG e o IVG foram obtidos segundo Nakagawa (1994).

Teor de clorofila a, b e total de plântulas germinadas. A quantificação do teor de clorofila foi efetuada por meio de quatro amostras por tratamento, aos sete dias após a semeadura. O material vegetal fresco foi macerado em 10ml de acetona 80%, em gral com pistilo, em sala com luz verde. O macerado foi submetido à filtração simples e o volume de acetona completado para 25ml (Arnon, 1949). Os dados obtidos foram calculados segundo Lichtenthaler (1987) e expressos em mg de clorofila /g massa fresca.

Condutividade elétrica (CE). Conduzida de acordo com metodologia de Krzyzanowski *et al.* (1991) em quatro subamostras de 50 sementes. As sementes tiveram sua massa previamente aferida e foram submetidas por 1h à embebição nos extratos nas diferentes concentrações. Decorrido o tempo, foram lavadas com água destilada, transferidas para recipientes contendo 80ml de água deionizada e mantidas em BOD, a temperatura constante de 20°C. A condutividade elétrica foi determinada após 3, 6

e 24h e os resultados expressos em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de sementes.

Comprimento de parte aérea e de radícula de plântulas. Foram utilizadas quatro subamostras de 10 plântulas, ao final do teste de germinação e de emergência em casa de vegetação aos 21 dias. O comprimento de parte aérea foi obtido pela distância entre a inserção da porção basal da radícula ao ápice da parte aérea, enquanto, o comprimento de radícula foi mensurado pela distância entre a parte apical e basal da radícula. Os resultados foram expressos em milímetros por plântula.

Massa seca total de plântulas. Obtidas a partir da massa de quatro subamostras de 10 plântulas, ao final do teste de germinação e de emergência em casa de vegetação aos 21 dias. As plântulas foram acondicionadas em envelopes de papel pardo e submetidas por 72h à secagem em estufa de ventilação forçada sob temperatura de 70°C até massa constante. Os resultados foram expressos em mg por plântula.

Emergência de plântulas em casa de vegetação (E). Conduzido em quatro subamostras de 50 sementes. A semeadura foi efetuada em bandejas de poliestireno expandido de duzentas células, contendo como substrato areia lavada. As sementes foram previamente colocadas entre três folhas de papel germitest umedecido com água destilada em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel por 5min, objetivando evitar dano por embebição. Decorrido o tempo, as sementes foram embebidas nos extratos de diferentes concentrações por 1h e conduzidas à semeadura. Vinte e um dias após a semeadura foi realizada a contagem final do número de plântulas emergidas, sendo os resultados expressos em porcentagem.

Conteúdo de H₂O₂ e peroxidação lipídica. Amostras de plântulas foram maceradas em N₂ líquido e homogeneizadas em 2ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. O homogenato foi

centrifugado a 13000g, durante 20min à 4°C e o sobrenadante utilizado para determinar o conteúdo de H₂O₂ e malondialdeído (MDA). Os níveis de H₂O₂ foram determinados de acordo com Velikova *et al.* (2000). Em tubos de ensaio contendo 0,7ml de tampão fosfato de potássio 10mM (pH 7,0) e 1ml de iodeto de potássio 1M, foram adicionados 0,3ml do sobrenadante, e incubado por 10min a 30°C. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro a 390nm e a concentração de H₂O₂ expressa em μmol de H₂O₂ /g de massa fresca. A peroxidação lipídica foi obtida via acúmulo de malondialdeído (MDA) e determinada por o método descrito por Cakmak e Horst (1991). Em tubos de ensaio contendo 0,3ml do sobrenadante foram adicionados a 1,7ml do meio de reação de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 10% (p/v), em seguida incubado a 90°C por 20min. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e após, centrifugadas novamente a 10000g durante 5min à 4°C e a absorbância do sobrenadante determinada em espectrofotômetro a 535 e 600nm. A quantidade de complexos MDA-TBA (pigmento vermelho) foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar ($\epsilon= 155\times 10^3\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Atividade enzimática. A determinação da atividade das enzimas antioxidantes foi efetuada por meio de amostras de matéria fresca de plântulas maceradas em gral e pistilo com N₂ líquido, contendo polivinilpirrolidona (PVPP) 20% e homogeneizados em 1,8ml de tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,8) contendo EDTA 0,1mM e ácido ascórbico 20mM. O extrato foi centrifugado a 13000g por 20min à 4°C e o sobrenadante utilizado para mensurar a atividade enzimática.

Superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1). A atividade foi avaliada pela capacidade da enzima inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) a 560nm em meio de reação contendo tampão fosfato de potás-

sio 50mM (pH 7,8), metionina 14mM, EDTA 0,1 μM , NBT 75 μM e riboflavina 2 μM , conforme Giannopolitis e Ries (1977). Uma unidade de atividade da SOD foi definida como a quantidade de enzima que produz uma inibição de 50% da redução fotoquímica do NBT.

Catalase (CAT; EC 1.11.1.6). Determinada pela decomposição do H₂O₂ conforme descrito por Azevedo *et al.* (1998). A atividade foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240nm ($\epsilon= 39,4\times 10^3\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), durante 2min em meio de reação de 4ml incubado a 30°C, contendo extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,0) e H₂O₂ 12,5mM.

Ascorbato peroxidase (AP; EC 1.11.1.11). Determinada por método proposto por Nakano e Asada (1981) pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato (ASA) por 2min a 290nm ($\epsilon= 2,80\times 10^3\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). O meio de reação foi incubado a 30°C e composto por tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,0) ácido ascórbico 0,5mM, H₂O₂ 0,1mM e extrato enzimático.

O delineamento experimental foi de blocos casualizados com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e, havendo significância a 5%, ajustados por polinômios ortogonais.

Resultados e Discussão

O teste de germinação de sementes de alfaca submetidas à ação do extrato de *Zantedeschia aethiopica* permitiu verificar similaridade nas porcentagens de germinação entre tratamentos 0; 6 e 12% (Figura 1a). Entretanto, o número de plântulas normais foi reduzido drasticamente a partir da concentração 25% que provocou redução de cerca de 60% no número de plântulas normais, enquanto, a concentração 50% do extrato inibiu totalmente a germinação. A provável explicação para tal ocorrência está relacionada à presença de flavonóides já isolados em *Z. ae-*

thiopica (Grecca *et al.*, 1998), classe de compostos fenólicos cuja atuação inibe a germinação de sementes (Ducca e Zonetti, 2008). Além disso, o sistema antioxidativo das plântulas de alface mostrou não ter sido suficientemente eficiente na eliminação de formas reativas de O₂ que se acumularam nos tecidos da semente frente ao estresse imposto, resultando em dano celular e aumento do número de plântulas anormais nas maiores concentrações do extrato, conforme evidenciado pela peroxidação lipídica em plântulas (Figura 3b). Han *et al.* (2008) verificaram que extratos de maior concentração de rizoma e de folha de gengibre reduziram pela metade a porcentagem de germinação de sementes de soja e de cebolinha. Enquanto, Zhang *et al.* (2010) obtiveram redução da germinação de sementes de rabanete ao aumentarem a concentração do extrato aquoso de eucalipto e Coelho *et al.* (2011) constataram a ocorrência de menos de 10% de plântulas normais ao submeterem sementes de alface à concentração de 50% do extrato de juazeiro.

A primeira contagem de germinação apresentou similaridade até a concentração 12%, o que pode ser relacionado à tentativa de aclimação e sobrevivência da espécie (Hong *et al.*, 2004). Houve posterior declínio acentuado da primeira contagem de germinação nas concentrações 25 e 50%, sendo o número de plântulas normais próximo de zero, na maior concentração (Figura 1a). Tal ocorrência evidencia que baixas concentrações do extrato não foram eficientes em causar fitotoxicidade à semente no início do processo germinativo. Esta ocorrência pode ser atribuída à menor sensibilidade da germinação ao efeito dos aleloquímicos

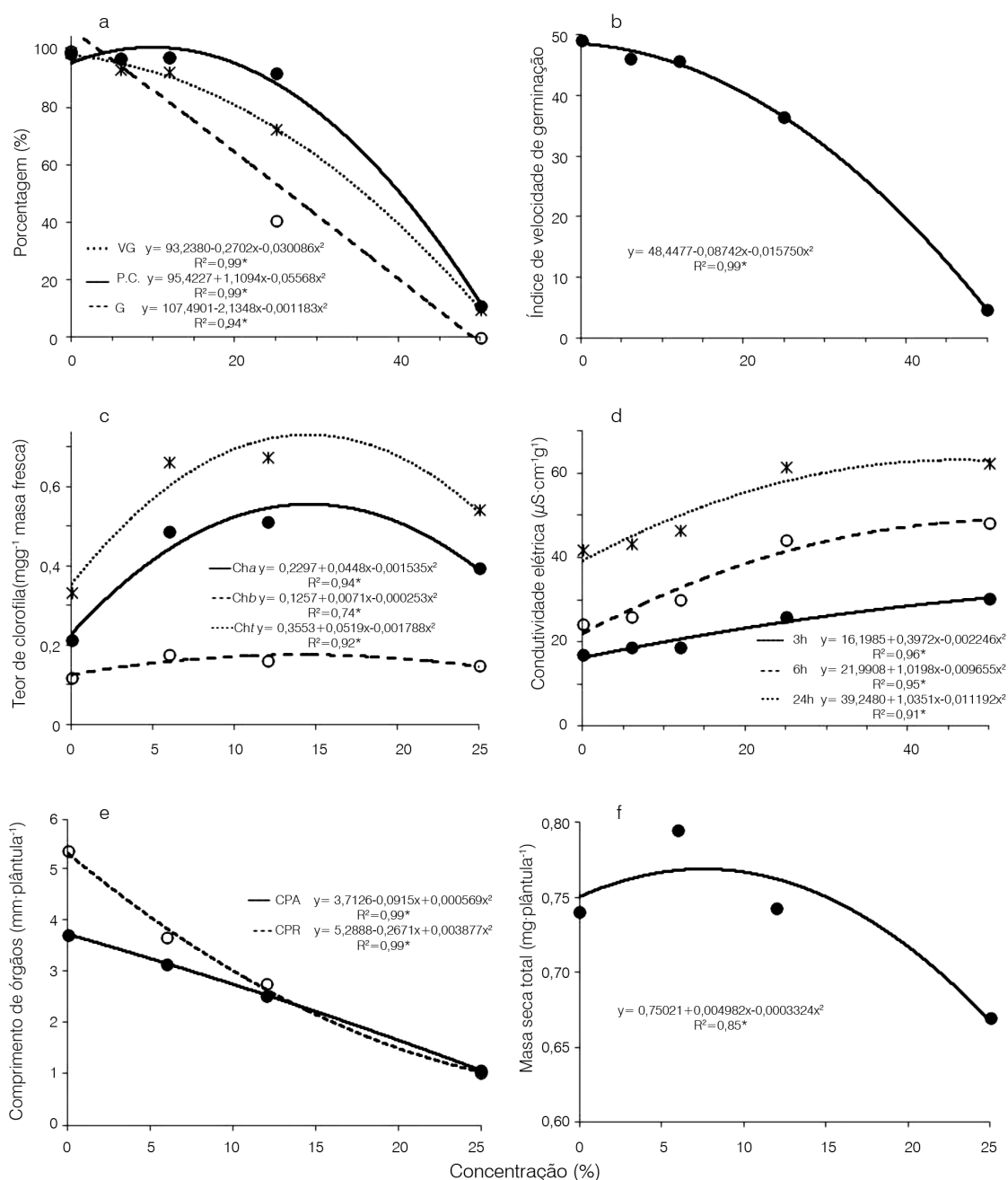


Figura 1. a: germinação (G), primeira contagem (PC) e velocidade de germinação (VG); b: índice de velocidade de germinação; c: teor de clorofila a, b e total de plântulas germinadas; d: condutividade elétrica de sementes; e: comprimento de parte aérea (CPA) e de radícula (CPR); e f: massa seca total de plântulas germinadas de alface sob ação de concentrações do extrato de *Z. aethiopica* (significativo a 5%*).

comparativamente ao crescimento inicial (Ferreira e Áquila, 2000).

A velocidade e o índice de velocidade de germinação tiveram tendência de redução drástica ao se aumentar a concentração do extrato (Figura 1a, b). Tal processo aconteceu a partir da concentração 6%, o que demonstra retardamento no processo germinativo com reflexos na redução do número

de sementes germinadas por dia, efeito ocasionado pelo extrato. Assim, é possível considerar que baixas concentrações do extrato, mesmo não aumentando a atividade das enzimas do metabolismo antioxidativo (Figura 3c, d, e), atuaram negativamente sobre alguma via do metabolismo germinativo da semente, talvez sobre a capacidade de hidrólise e mobilização de reservas com vistas à for-

mação de esqueletos carbônicos voltados ao crescimento do embrião (Muniz *et al.*, 2007). Singh *et al.* (2009) verificaram redução do número de sementes de milho germinadas por dia, com o aumento da concentração do extrato aquoso de *Nicotiana plumbaginifolia*, assim como Lima *et al.* (2011) ao submeterem sementes de alface a fração clorofórmio do extrato etanólico de *Euterpe edulis*.

Os teores de clorofila a, b e total apresentaram níveis distintos (Figura 1c), não sendo possível avaliar o efeito da concentração 50%, pela ausência de material vegetal suficiente para análise. A clorofila a mostrou tendência ao aumento até a concentração 14,6% com posterior redução até a maior concentração do extrato avaliada, semelhante ao ocorrido com o teor de clorofila b, fato que colaborou para a redução do teor de clorofila total. O aumento no teor de clorofila a pode estar relacionado à reação de conversão da clorofila b em clorofila a por meio da enzima oxigenase, que catalisa a conversão do grupo metil a um grupo aldeído (Streit *et al.*, 2005). Entretanto, embora tenha ocorrido elevação no teor de clorofila a, em tese, não há garantia de maior eficiência na captação de energia radiante em tal processo, o qual também possui estreita relação ao teor de clorofila b, cujo incremento foi menos marcante. A clorofila b além de estar envolvida na absorção de energia luminosa possui função

fotoprotetora (Marenco e Lopes, 2007), o que pode explicar sua suave elevação frente ao estresse imposto pelas menores concentrações do extrato. Cabe salientar que aleloquímicos interferem na fotossíntese por modificações no conteúdo de clorofila envolvendo enzimas clorofilases (Chou, 1999), sendo conhecido que flavonóides, ácidos fenólicos, cumarinas e polifenóis estão entre os principais aleloquímicos que alteram o transporte de elétrons e a fosforilação nos fotossistemas, inibindo a fotosíntese (Rizvi *et al.*, 1992). Aliado, como maiores concentrações do extrato proporcionaram redução quanti-qualitativa dos teores de clorofila é possível verificar o seu efeito negativo sobre o aparato fotossintético da plântula, o que permite evidenciar o efeito estressor proporcionado pelo extrato, conforme evidenciado pelo aumento da peroxidação lipídica e atividade das enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX; Figura 3c, d, e).

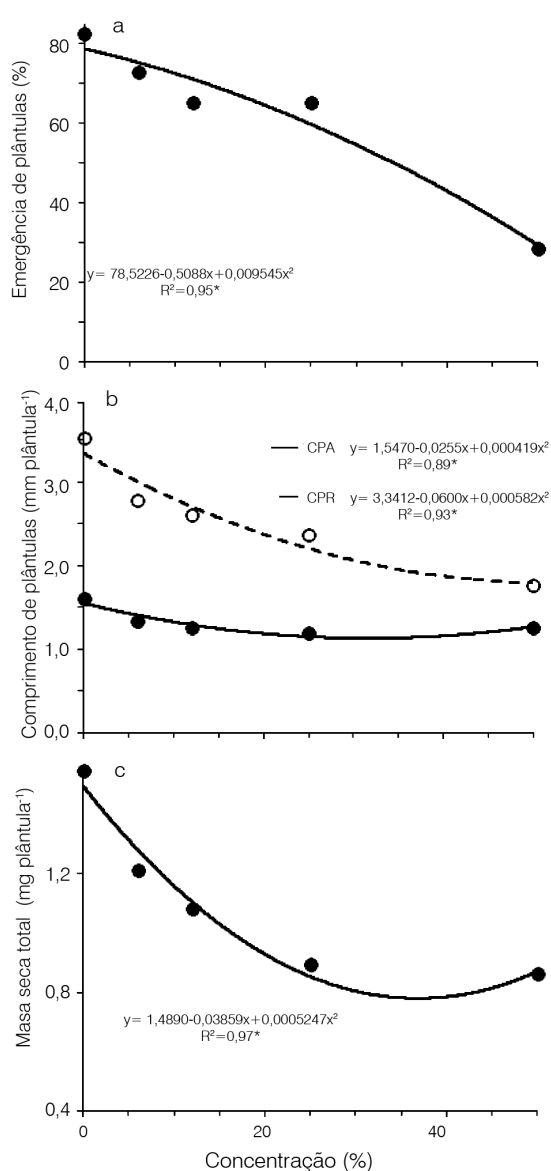


Figura 2. a: emergência de plântulas em casa de vegetação; b: comprimento de parte aérea (CPA) e de radícula (CPR); e c: massa seca total de plântulas de alface emergidas sob ação de concentrações do extrato de *Z. aethiopica* (significativo a 5% *).

síntese (Rizvi *et al.*, 1992). Aliado, como maiores concentrações do extrato proporcionaram redução quanti-qualitativa dos teores de clorofila é possível verificar o seu efeito negativo sobre o aparato fotossintético da plântula, o que permite evidenciar o efeito estressor proporcionado pelo extrato, conforme evidenciado pelo aumento da peroxidação lipídica e atividade das enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX; Figura 3c, d, e).

A condutividade elétrica aumentou com a concentração do extrato nos três tempos de incubação indicando que indiferentemente ao tempo, houve em relação à concentração zero, tendência ao aumento na liberação de eletrólitos ao aumentar a concentração do extrato (Figura 1d). A liberação exacerbada de eletrólitos para o meio pode ser explicada pela redução da capacidade de reorganização da bicamada fosfolipídica e conseqüente perda da capacidade seletiva. Este fato aliado ao aumento na quantidade de H_2O_2 e da peroxidação lipídica verificados nas plântulas de alface (Figura 3a, b) é indicativo que o efeito fitotóxico do extrato possui ação no sistema de membranas celulares da semente e da plântula, que por sua vez, reflete-se no elevado número de plântulas anormais em concentrações mais elevadas do extrato.

O comprimento da parte aérea e radícula apresentaram relação dose-resposta em laboratório e em casa de vegetação, com elevado nível de significância (Figura 1e, 2b). Houve tendência de redução do comprimento em ambas as características de crescimento ao aumentar a concentração do extrato. As plântulas sofreram maior efeito prejudicial do extrato sobre a radícula do que na parte aérea. Entretanto, em plântulas sob condições laboratoriais houve forte indicio de oxidação da radícula nas concentrações 25 e 50% devido ao

acúmulo de H_2O_2 (Figura 3a) e a ineficiência na detoxicação dos tecidos pelas enzimas superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase, mesmo com a elevação acentuada da sua atividade (Figura 3c, d, e). Corroborando, a formação de anomalias na plântula pode ser resultado da presença de flavonóides que atuam alterando a permeabilidade das membranas celulares (Basilea *et al.*, 2003). O efeito mais pronunciado do extrato sobre a radícula pode ser atribuído à maior sensibilidade e pelo contato direto dos tecidos com o extrato (Chung *et al.*, 2001). Enquanto, a redução do comprimento de ambos os órgãos da plântula é devida à influência do extrato sobre o balanço hormonal da plântula (Alves e Santos, 2002). Cabe salientar que o comprimento de parte aérea não foi reduzido em detrimento da radícula, o que exclui o efeito de situações que simulam o déficit hídrico (Marenco e Lopes, 2007) e permite evidenciar o efeito tóxico do extrato sobre estes atributos de crescimento. Similarmente, Lima e Moraes (2008) obtiveram redução de radícula e de parte aérea ao testarem o efeito do extrato aquoso de *Ipomoea fistulosa* sobre a germinação e o crescimento inicial de alface e tomateiro. Enquanto, extratos de *Dicranopteris flexuosa* aumentam o crescimento da radícula de plântulas de alface e não alteram o comprimento de parte aérea (Silva *et al.*, 2011).

A massa seca total mostrou tendência ao aumento em plântulas obtidas em laboratório até a concentração 6% (Figura 1f), sendo o aumento do crescimento em menores concentrações do extrato, um mecanismo de defesa e sobrevivência vegetal (Hong *et al.*, 2004). A partir da concentração 12%, ocorreu decréscimo acentuado na massa seca total de maneira que plântulas submetidas à concentração 50% não obtiveram massa suficiente para aferição. Similarmente aos resultados obtidos em laboratório, o aumento na concentração do extrato de *Z. aethiopica* promoveu a redução da massa seca total nas plântu-

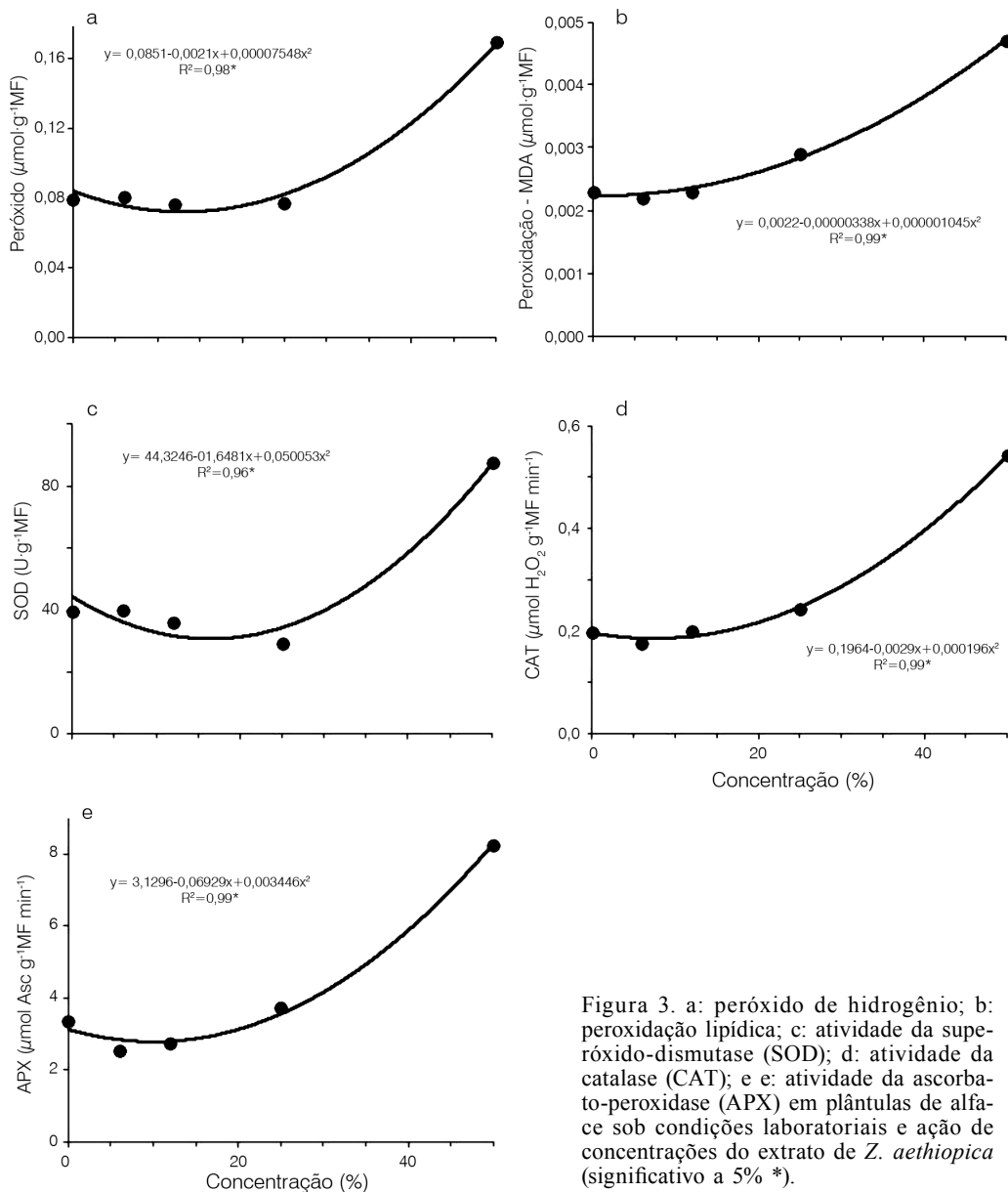


Figura 3. a: peróxido de hidrogênio; b: peroxidação lipídica; c: atividade da superóxido-dismutase (SOD); d: atividade da catalase (CAT); e: atividade da ascorbato-peroxidase (APX) em plântulas de alface sob condições laboratoriais e ação de concentrações do extrato de *Z. aethiopica* (significativo a 5% *).

las em casa de vegetação, sendo as diferenças incrementadas a partir da concentração 6% (Figura 2c). Tal característica de crescimento reforça a teoria de que a velocidade de germinação possa ter sido reduzida pela ação negativa do extrato sobre o sistema enzimático hidrolítico e de mobilização de reservas da semente, o que tem relação com a inibição da atividade da enzima α -amilase na presença de compostos fenólicos ou ainda, a inibição na síntese de ácido giberélico (Politycka e Gmerek, 2008). Ao avaliarem o efeito do extrato aquoso de leucena sobre sementes de milho, Pires *et al.*

(2001) observaram redução da massa seca total das plântulas.

A emergência de plântulas foi reduzida com o aumento da concentração do extrato em uma relação dose-resposta (Figura 2a). Houve em sementes submetidas à concentração 6% do extrato a redução de 10% na emergência de plântulas, sendo esta variável, drasticamente reduzida em 55% na maior concentração do extrato comparativamente à concentração nula. Os resultados de emergência foram menos afetados em comparação aos dados de germinação obtidos em laboratório, o que se deve às condições favoráveis de labo-

ratório, que além da germinação, favoreceram a absorção e a translocação dos compostos presentes no extrato. A partir da avaliação da emergência, é possível inferir que o extrato de *Z. aethiopica* possui ação negativa sobre o vigor de sementes de alface, com estreita relação à danificação do sistema de membranas celulares, conforme evidenciado pelo aumento da condutividade elétrica com o incremento da concentração do extrato (Figura 1d). Além disso, é possível verificar a similaridade entre os resultados de germinação em laboratório, fato que discorda de Silva *et al.* (2011)

que ao testarem o efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico de *Dicranopteris flexuosa* não verificaram diferenças na emergência de plântulas de alface, tomate e cebolinha.

A atividade das enzimas superóxido-dismutase, catalase e ascorbato peroxidase foi altamente influenciada pela elevação na concentração do extrato de *Z. aethiopica* (Figura 3c, d, e). Houve tendência de acréscimo da atividade com a elevação da concentração do extrato. Entretanto, plântulas sob a ação das concentrações 0, 6 e 12% apresentaram respostas similares e menor atividade das enzimas SOD, CAT e APX aliado aos menores níveis de H_2O_2 e peroxidação lipídica (Figura 3a, b). Enquanto, plântulas expostas a concentrações 25 e 50% tiveram tendência de elevação acentuada na atividade das enzimas SOD, CAT e APX com o aumento da quantidade de H_2O_2 e da peroxidação lipídica, sendo mais drástico o efeito quanto maior concentração. A elevação da atividade antioxidante da enzima superóxido-dismutase ocorreu em resposta ao estresse imposto pelo extrato aos tecidos das plântulas, provavelmente devido à elevação da quantidade de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e visando promover a dismutação deste radical a H_2O_2 (Sinha e Saxena, 2006). A elevação no H_2O_2 ativou a enzima catalase que em conjunto com a enzima ascorbato-peroxidase foi responsável, até certo ponto, pela degradação do H_2O_2 e liberação de água pela APX e ainda, água e O_2 molecular pela CAT (Barreiros *et al.*, 2006). Cabe salientar que, nas concentrações 6 e 12%, o dano ocasionado às plântulas foi menos acentuado, provavelmente devido ao sistema antioxidativo manter o equilíbrio entre a formação e a degradação de H_2O_2 (Matés, 2000). Por outro lado, as concentrações 25 e 50% promoveram severo estresse às plântulas, estimulando acentuadamente a elevação da atividade das enzimas SOD, CAT e APX. En-

tretanto, é possível inferir que a elevação da atividade destas enzimas não foi suficiente para a eliminação dos radicais livres, com reflexos no aumento da concentração de H₂O₂ e consequente peroxidação lipídica, com danos ao sistema de membranas celulares, resultando no aumento da incidência de plântulas anormais. Ao submeter plântulas de pepino a diferentes concentrações e extratos desta mesma espécie, Yu *et al.* (2003) obtiveram aumento da atividade enzima superóxido-dismutase e da peroxidação lipídica, enquanto Singh *et al.* (2009) observaram elevação na atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, ao expor plântulas de milho ao extrato aquoso de *Nicotiana plumbaginifolia*.

Uma análise geral dos resultados obtidos permite verificar que concentrações superiores, entre 25% e 50%, do extrato de *Z. aethiopica* influenciaram de forma prejudicial o desempenho fisiológico de sementes de alfaca, bem como os parâmetros de crescimento de plântulas.

Conclusões

O aumento da concentração do extrato de folhas de *Zantedeschia aethiopica* afeta negativamente a qualidade fisiológica de sementes de alfaca; o extrato, mesmo promovendo o aumento da atividade das enzimas do metabolismo antioxidativo, ocasiona fitotoxicidade em plântulas de alfaca, devido à provável ineficiência das enzimas envolvidas na detoxicação das plântulas de alfaca; a fitotoxicidade proporcionada pelo extrato possui relação com o acúmulo de formas reativas de oxigênio e alterações fisiológicas em nível de membranas celulares, afetando negativamente o vigor da semente e refletindo em atributos de crescimento das plântulas.

AGRADECIMENTOS

A CAPES, pela concessão de bolsa de doutorado ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS

- Alves SM, Santos LS (2002) Natureza química dos agentes alelopáticos. Em Souza Filho APS, Alves SM (Eds.) *Alelopatia: Princípios Básicos e Aspectos Gerais*. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, Brasil. pp. 25-47.
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15.
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ (1998) Response from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation in leaves and roots of wild type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104: 280-292.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP (2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova* 29: 113-123.
- Basilea A, Sorboa S, Lopez-Sáez JA, Cobianchi RC (2003) Effects of seven pure flavonoids from mosses on germination and growth of *Tortula muralis* HEDW (Bryophyta) and *Raphanus sativus* L. (Magnoliophyta). *Phytochemistry* 62: 1145-1151.
- Brasil (2009) *Regras para Análise de Sementes*. SNAD/CLAV. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Brasília, Brasil. 398 pp.
- Cakmak I, Horst WJ (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* 83: 463-468.
- Chou CH (1999) Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 609-630.
- Chou CH (2006) Introduction to allelopathy. Em Reigosa MJ, Pedrol N, González L (Eds) *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*. Springer. Dordrecht, Holanda. 637 pp.
- Chung IM, Ahn JK, Yun SJ (2001) Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) on rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Crop Protect.* 20: 921-928.
- Coelho MFB, Maia SSS, Oliveira AK, Diógenes FEP (2011) Atividade alelopática de extrato de sementes de juazeiro. *Hort. Brás.* 29: 108-111.
- Ducca F, Zonetti PC (2008) Efeito alelopático do extrato aquoso da aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) na germinação e desenvolvimento de soja (*Glycine max* L. Merrill). *Rev. Agroneg. Meio Amb.* 1: 101-109.
- Ferreira AG, Aquila MEA (2000) Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. *Rev. Brás. Fisiol. Veg.* 12: 175-204.
- Giannopolitis CN, Ries SK (1997) Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59: 309-314.
- Greca MD, Ferrara M, Fiorentino A, Monaco P, Previtiera L (1998) Antialgal compounds from *Zantedeschia aethiopica*. *Phytochemistry* 49: 1299-1304.
- Han C, Pan K, Wu N, Wang J, Li W (2008) Allelopathic effect of ginger on seed germination and seedling growth of soybean and chive. *Sci. Hort.* 116: 330-336.
- Hong NH, Xuan TD, Eiji T, Khanh TD (2004) Paddy weed control by higher plants from Southeast Asia. *Crop Protect.* 2: 255-261.
- Krzyzanowski FC, França-Neto JB, Henning AA (1991) Relato dos testes de vigor disponíveis para grandes culturas. *Inf. ABRATES* 1: 15-50.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.* 148: 350-382.
- Lima CP, Cunico MM, Trevisan RR, Philippsen AF, Miguel OG, Miguel MD (2011) Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. *Acta Bot. Brás.* 25: 331-336.
- Lima JD, Moraes WS (2008) Potencial alelopático de *Ipomoea fistulosa* sobre a germinação de alfaca e tomate. *Acta Sci. Agron.* 30: 409-413.
- Macias FA, Molinillo JMG, Varela RM, Galindo JCG (2007) Allelopathy - a natural alternative for weed control. *Pest Manag. Sci.* 63: 327-348.
- Marengo RA, Lopes NF (2007) *Fisiologia Vegetal: Fotossíntese, Respiração, Relações Hídricas e Nutrição Mineral*. 2ª ed. UFV. Viçosa, Brasil. 451 pp.
- Matés JM (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153: 83-104.
- Muniz FR, Cardoso MG, Von Pinho EVR, Villela M (2007) Qualidade fisiológica de sementes de milho, feijão, soja e alfaca na presença de extrato de tiririca. *Rev. Brás. Sementes* 29: 195-204.
- Nakagawa J (1994) Testes de vigor baseados na avaliação de plântulas. Em Vieira RD, Carvalho M (Eds.) *Testes de Vigor em Sementes*. FUNEP. Jaboticabal, Brasil. pp. 49-85.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880.
- Pires NM, Souza IRP, Prates HT, Faria TCL, Pereira Filho IA, Magalhães PC (2001) Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 13: 55-65.
- Politycka B, Gmerek J (2008) Effect of ferulic and p-coumaric acid on the activity of hydrolytic enzymes and growth of radicals in germinating seeds of cucumber and pea. *Allelopathy J.* 21: 227-238.
- Rosa SDVF, Rezende EVRVP, Vieira ESN, Veiga RD, Veiga AD (2005) Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas *lea* associadas à tolerância de sementes milho à alta temperatura de secagem. *Rev. Brás. Sementes* 27: 91-101.
- Rice EL (1984) *Allelopathy*. 2ª ed. Academic Press: Nova York, EEUU. 422 pp.
- Rizvi SJH, Haque H, Singh VK, Rizvi V (1992) A discipline called allelopathy. Em Rizvi SJH, Rizvi V (Eds.) *Allelopathy: Basic and Applied Aspects*. Chapman & Hall. Londra, RU. 504 pp.
- Silva VS, Cândido ACS, Muller C, Laura VA, Faccenda O, Simionatto E, Hess SC, Peres MTLP (2011) Potencial fitotóxico de *Dicranopteris flexuosa* (Schrad.) Underw. (Gleicheniaceae). *Acta Bot. Brás.* 25: 95-104.
- Sinha S, Saxena R (2006) Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and nonenzymatic antioxidants and bacoside-a content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62: 1340-1350.
- Singh A, Singh D, Singh NB (2009) Allelochemical stress produced by aqueous leachate of *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. *Plant Growth Regul.* 58: 163-171.
- Streit MN, Canterle LP, Canto MW, Hecktheuer LHH (2005) As clorofilas. *Ciênc. Rural* 35: 748-755.
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Sci.* 151: 59-66.
- Yu JQ, Ye SF, Zhang MF, Wen HH (2003) Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. *Biochem. Systemat. Ecol.* 31: 129-139.
- Zhang D, Zhang J, Yang W, Wu F (2010) Potential allelopathic effect of *Eucalyptus grandis* across a range of plantation ages. *Ecol. Res.* 25: 13-23.