

Fitotoxicidade do extrato de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist no desempenho fisiológico de sementes e plântulas de alface

Tuane Araldi da Silva, Dominique Delias, Tiago Pedó, Everton Sozo de Abreu,
Francisco Amaral Villela & Tiago Zanatta Aumonde

Universidade Federal de Pelotas, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS. tuanearaldi17@gmail.com, domi_delias@hotmail.com, tiago.pedo@gmail.com, sozodeabreu@hotmail.com, francisco.villela@ufpel.edu.br, tiago.aumonde@gmail.com

Recebido em 25.V.2015

Aceito em 30.IX.2016

RESUMO – Este trabalho objetivou avaliar a influência de concentrações do extrato de *C. bonariensis* sobre o desempenho fisiológico de sementes e no metabolismo antioxidativo de plântulas de alface. Os tratamentos foram as concentrações de 0; 2; 4; 6 e 8 % do extrato aquoso de folhas. Foram avaliados a germinação, primeira contagem de germinação, índice de velocidade de germinação, condutividade elétrica, emergência de plântulas, massa seca total de plântulas, conteúdo de peróxido de hidrogênio, peroxidação de lipídeos, atividade das enzimas, superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase. O extrato de *C. bonariensis* possui efeito tóxico sobre sementes e plântulas de alface. As maiores concentrações do extrato (6 e 8 %) proporcionam maior inibição da germinação e do crescimento inicial de plântulas. O aumento da concentração do extrato resulta na elevação da condutividade elétrica em sementes, dos níveis de peróxido de hidrogênio, da peroxidação lipídica e das enzimas superóxido-dismutase, catalase e ascorbato-peroxidase.

Palavras-chave: buva, enzimas, *Lactuca sativa*, toxicidade

ABSTRACT – **Phytotoxicity of *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist extract on the seeds and lettuce seedlings physiological performance.** This study evaluated the influence of *C. bonariensis* extract concentrations on the physiological performance of seeds and the antioxidative metabolism of lettuce seedlings. The treatments were concentrations of 0; 2; 4; 6 and 8 % of the aqueous extract of leaves. The germination, speed index, electrical conductivity, seedling emergence, total dry mass of seedlings, hydrogen peroxide content, lipid peroxidation, enzyme activity, superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase were evaluated. *C. bonariensis* extract has toxic effects on seeds and lettuce seedlings. The higher extract concentrations (6 and 8 %) inhibited the germination and early growth of seedlings more. Increasing the concentration of the extract resulted in an increase of electrical conductivity in seeds and increased the levels of hydrogen peroxide, lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase.

Keywords: enzymes, horseweed, *Lactuca sativa*, toxicity

INTRODUÇÃO

A espécie *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist pertencente à família Asteraceae, é uma planta autógama originária da América do Sul (Kissman & Groth 1999), popularmente conhecida como Buva. Possui ciclo anual e caracteriza-se por ser muito prolifera, podendo produzir mais de 200 mil sementes viáveis em uma única planta (Bhowmik & Bekech 1993), forma infestação densa e possui boa adaptabilidade ao sistema de semeadura direta ou de cultivo mínimo (Lamego *et al.* 2013), apresentando resistência ao herbicida glyphosate (Paula *et al.* 2011).

Os aleloquímicos presentes em extratos de origem vegetal podem inibir ou estimular a germinação e o crescimento inicial de outras espécies (Macías *et al.* 2007), ao danificarem ou inativarem vias do sistema metabólico. Estes compostos fitotóxicos podem alterar a fluidez da bicamada fosfolipídica do sistema de membranas celulares, ocasionar alterações em nível hormonal e fotossintético ou ainda ocasionar acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Chou 2006, Panda & Khan 2009).

Em condições de estresse as plantas tendem a

desenvolver respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, por meio de vários metabólitos secundários (Omezzine *et al.* 2014a). Alterações em nível metabólico que estão relacionadas à modificação da atividade enzimática antioxidante como da catalase, superóxido-dismutase e ascorbato-peroxidase, em plantas sob ação do aleloquímico, constituem tentativa de sobrevivência à nova condição de meio ambiente e estão relacionadas ao mecanismo de autodefesa vegetal (Forman *et al.* 2010, Omezzine *et al.* 2014).

Estudos têm demonstrado o potencial tóxico de plantas daninhas sobre plantas cultivadas e fornecido evidências convincentes da sua importância para o seu maior poder competitivo (Cipollini *et al.* 2008, Inderjit *et al.* 2008, Thorpe *et al.* 2009; Chapla & Campos 2010, Pisula & Meiners 2010). Contudo, embora a espécie *C. bonariensis* represente problema para a produtividade agrícola, as alterações fisiológicas ocasionadas por possíveis efeitos tóxicos desta espécie, ainda são pouco conhecidas.

Este trabalho objetivou avaliar a influência de concentrações do extrato de *C. bonariensis* sobre o

desempenho fisiológico de sementes e no metabolismo antioxidativo de plântulas de alfaca.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, campus Capão do Leão, RS, Brasil.

O material vegetal empregado para a elaboração do extrato aquoso foram folhas de Buva. A coleta das folhas foi realizada na segunda quinzena do mês de agosto, no ano de 2013, na região do planalto médio do Estado do Rio Grande do Sul, na cidade de Santa Bárbara do Sul, sob coordenadas geográficas de latitude 28°22'09" S, longitude 53°14'46" W e altitude 511 m. O clima regional é subtropical úmido, tipo Cfa, com precipitação total anual de 1.727 mm, sendo janeiro o mês mais quente, com máxima normal de 30 °C, e julho o mês mais frio, com mínima normal de 8,6 °C. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico Típico de textura média (Berg & Klamt 1997).

As plantas estavam em estágio de desenvolvimento vegetativo de 12 a 14 folhas, no momento de coleta, a qual foi realizada no período da manhã, entre nove e dez horas. Foram utilizadas folhas provenientes do terço médio das plantas, procedeu-se uma pré-secagem à sombra, durante oito horas. Depois disso, as folhas foram acondicionadas em papel Kraft e transportadas para o laboratório de Fisiologia de Sementes, as quais foram previamente lavadas em água destilada, secas em papel toalha e desidratadas à temperatura de 40 °C, até massa constante. Em seguida, foram trituradas em moinho de facas tipo Willey, com peneira de malha 0,8 mm, acondicionadas em sacos de papel kraft, e mantidos em ambiente frio e seco (15 °C e 40 % de UR).

Os tratamentos foram as concentrações de 0; 2; 4; 6 e 8 % do extrato, sendo para tal, utilizados 0; 20; 40; 60 e 80 gramas de folhas trituradas de Buva, respectivamente, em uma relação *m/v* entre material vegetal e água deionizada. Ao material seco e triturado, foi adicionado 1 litro de água deionizada à temperatura 100 °C e mantido sob agitação constante por 30 minutos. Posteriormente, submetido a filtração a vácuo e o filtrado armazenado em frascos âmbar, sob refrigeração (10 °C).

Os extratos das diferentes concentrações tiveram o pH e o potencial osmótico determinados. O pH atingiu os valores de 7,02 e 7,8, enquanto que, o potencial osmótico de $-0,4 \times 10^{-4}$ (concentração 0 %) e $-1,93 \times 10^{-4}$ MPa (concentração 8 %). O pH foi determinado por pHmetro digital de bancada da marca Digimed®, modelo DM-22 e o potencial osmótico foi calculado segundo efetuado por Khaliq *et al.* (2013).

Os efeitos das concentrações do extrato sobre o desempenho fisiológico de sementes e o metabolismo antioxidativo de plântulas foram determinados a partir das seguintes avaliações, sobre sementes de alfaca:

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 seco, com as diferentes concentrações do extrato. Posteriormente, as caixas foram transferidas para câmara de germinação tipo BOD a 20 °C e período luminoso de 12 horas. As avaliações foram efetuadas aos sete dias após a semeadura e os resultados foram 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).

Índice de velocidade de germinação (IVG): obtido a partir de contagens diárias das sementes germinadas, com protrusão radicular mínima de 3 a 4 mm. As contagens foram realizadas até a estabilização da germinação e o cálculo do índice de velocidade de germinação determinado conforme equação de Maguire (1962).

Condutividade elétrica: conduzida de acordo com metodologia proposta por Krzyzanowski *et al.* (1991), em quatro subamostras de 50 sementes. A massa das sementes foi previamente aferida, sendo as mesmas, submetidas posteriormente à embebição nas diferentes concentrações do extrato, pelo período de uma hora. Após o período de embebição, as sementes foram lavadas com água destilada e transferidas para recipientes contendo 80 mL de água deionizada, sendo mantidas em BOD, a temperatura constante de 20 °C. A condutividade elétrica foi determinada após 3; 6 e 24 horas de embebição em água deionizada e os resultados foram expressos em $iS \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de semente.

Emergência de plântulas em casa de vegetação: o teste foi conduzido em quatro subamostras de 50 sementes. A semeadura foi efetuada em bandejas de poliestireno expandido de duzentas células, contendo como substrato areia lavada de granulometria média. Para isso, as sementes foram previamente colocadas entre três folhas de papel Gernitest umedecido com água destilada na proporção a 2,5 vezes a massa do papel seco, pelo período de cinco minutos, objetivando evitar danos por embebição. Em seguida, as sementes foram embebidas nas diferentes concentrações do extrato por uma hora e semeadas. Aos vinte e um dias após a semeadura foi realizada a contagem final do número de plântulas emergidas, sendo os resultados expressos em porcentagem.

Comprimento de parte aérea e de raiz primária de plântulas: foram utilizadas quatro subamostras de 10 plântulas, ao final do teste de germinação e de emergência de plântulas em casa de vegetação. O comprimento de parte aérea foi obtido pela distância entre a inserção da

porção basal da raiz primária ao ápice da parte aérea. O comprimento da raiz primária foi determinado pela distância entre sua parte apical e basal. Os resultados foram expressos em centímetros por plântula.

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

Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica: foram determinados a partir de amostras da massa fresca total provenientes do tecido vegetal, coletado de plântulas ao final do teste de germinação.

Aproximadamente 0,2 g de amostra de tecido fresco foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1 % e o homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g, durante 20 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante utilizado para determinar o conteúdo de H₂O₂ e malondialdeído (MDA). Em tubos de ensaio, contendo 0,7 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 1 mL de iodeto de potássio 1 M, foram adicionados 0,3 mL do sobrenadante, sendo incubados por 10 minutos a 30 °C. Os níveis de peróxido de hidrogênio foram determinados de acordo com Velikova *et al.* (2000) e a concentração de H₂O₂ expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ de massa fresca.

A peroxidação lipídica foi obtida via acúmulo de malondialdeído (MDA) e determinada por metodologia descrita por Cakmak & Horst (1991). Em tubos de ensaio contendo 0,3 mL do sobrenadante foram adicionados 1,7 mL do meio de reação de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 10 % (p/v). E, em seguida o mesmo foi incubado a 90 °C, por 20 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e após, centrifugada a 10.000 g durante cinco minutos, a 4 °C. A absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro a 535 e 600 nm e a quantidade de complexos MDA-TBA (pigmento vermelho) foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 155 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

Atividade das enzimas antioxidantes: avaliada em tecido vegetal fresco, proveniente de plântulas obtidas ao final do teste de germinação. Aproximadamente 0,2 g de tecido vegetal foram maceradas em gral com pistilo e nitrogênio líquido, contendo polivinilpolipirrolidona (PVPP) a 20 % e homogeneizados em 1,8 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8) contendo EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 20 mM. O extrato foi centrifugado a 13.000 g pelo período de 20 minutos à temperatura de 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para mensurar a atividade enzimática.

Superóxido dismutase (SOD - EC 1.15.1.1): a atividade

da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) a 560 nm, em meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 iM, NBT 75 iM e riboflavina 2 iM (Giannoploitis & Ries 1997). Os resultados foram expressos em U g^{-1} MF.

Catalase (CAT - EC 1.11.1.6): determinada pela decomposição do H₂O₂ conforme proposto por Azevedo *et al.* (1998). A atividade da CAT foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm ($\epsilon = 39,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), durante dois minutos em meio de reação de 4 mL que foi incubado a 30 °C, contendo extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e peróxido de hidrogênio 12,5 mM. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MF min}^{-1}$.

Ascorbato peroxidase (APX - EC 1.11.1.11): determinada conforme metodologia de Nakano & Asada (1981) pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato (ASA) pelo tempo de 2 minutos a 290 nm ($\epsilon = 2,80 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O meio de reação foi incubado a 30 °C e composto por tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) ácido ascórbico 0,5 mM, H₂O₂ 0,1 mM e extrato enzimático. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol Asc g}^{-1} \text{ MF min}^{-1}$.

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação e a primeira contagem de germinação apresentaram tendência ao decréscimo com o aumento da concentração do extrato de *Conyza bonariensis* (Fig. 1a). O ponto de mínima resposta ocorreu na concentração 8 % tanto para a primeira contagem de germinação, quanto para a germinação. Houve, na concentração de 8 % em relação à concentração zero, redução de 89,7 % na germinação de sementes e de 93,8 % na primeira contagem de germinação.

A redução da germinação pode estar relacionada a ação do composto sobre vias de hidrólise de reservas (Muniz *et al.* 2007). Os menores valores de germinação obtidos na primeira contagem estão relacionados à redução do vigor de sementes (Krzyzanowsky *et al.* 1999). Além disso, a redução da germinação, com o aumento da concentração do extrato, pode estar relacionada a maior concentração de compostos tóxicos.

O extrato de parte aérea de *Trigonella foenum-graecum*, segundo Omezzine *et al.* (2014b), reduz em até 50 % a germinação de sementes de alface ao elevar a concentração do extrato. Nery *et al.* (2013) ao analisarem a ação do extrato de *Raphanus sativus*, verificaram redução dos valores de primeira contagem da germinação de sementes de alface.

O índice de velocidade de germinação apresentou decréscimo ao aumentar a concentração do extrato de *C.*

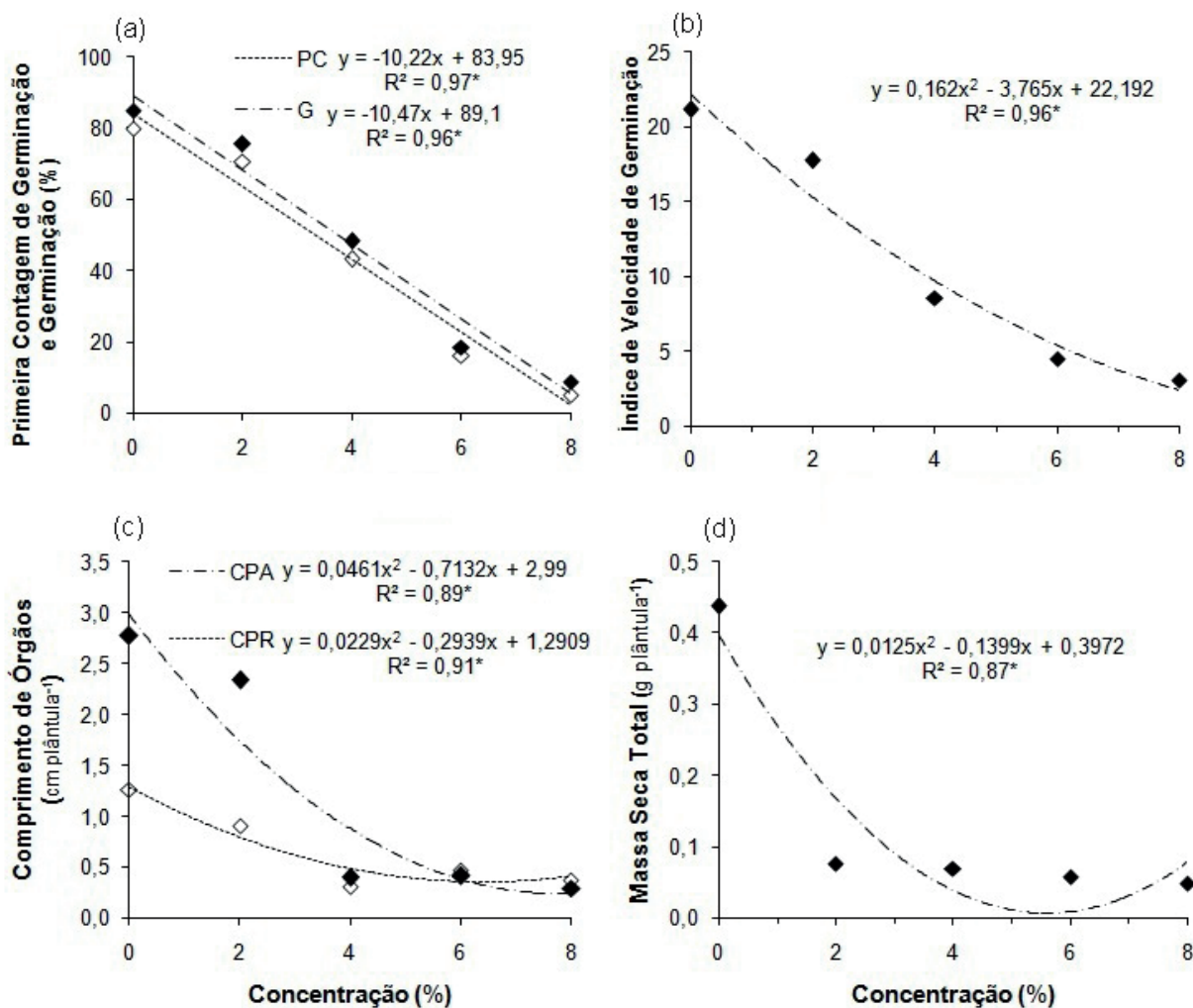
bonariensis (Fig. 1b). O ponto de mínima resposta ocorreu na concentração de 8 %. A redução do índice de velocidade de germinação com o incremento da concentração do extrato, demonstrou redução do número de sementes germinadas por dia. Houve diminuição de 16; 59; 78,6 e 85 %, nas concentrações de 2; 4; 6 e 8 %, respectivamente, quando comparada a concentração zero.

A redução do índice de velocidade de germinação pode manter relação ao nível de compostos tóxicos presentes no extrato, estando o efeito, relacionado à espécie do qual é extraído (WU *et al.* 2009). De acordo com Carvalho *et al.* (2014), extratos de *Canavalia ensiformis* e de *Sorgum bicolor* reduzem o índice de velocidade de germinação de sementes de alface na concentração de 10 %. Hoffmann *et al.* (2007) relatam que o aumento da concentração do extrato aquoso de *Nerium oleander* e *Dieffenbachia amoena*, promove a redução do índice de velocidade de germinação de sementes de *Bidens pilosa*.

O crescimento de plântulas de alface foi influenciado negativamente pelo extrato utilizado (Figs. 1c; 1d).

Os pontos de mínima resposta foram observados na concentração de 7,7 % para o comprimento de parte aérea e, na concentração de 6,4 % para o comprimento de raiz primária. Ocorreu redução no comprimento de parte aérea e de raiz primária ao incrementar a concentração do extrato, sendo que plântulas sob ação da concentração 8 % apresentaram redução de 89,5 % em parte aérea e de 70,6 % em raízes primárias, quando comparado a concentração 0 %. Tais resultados corroboram com Peres *et al.* (2009), que observaram redução no crescimento de raiz de plântulas de alface sob ação do extrato de *Microgramma vacciniifolia*. De acordo Hu & Zhang (2013) a utilização do extrato aquoso de parte aérea de *Conyza canadenses* inibe o crescimento da parte aérea de *Plantago asiatica*, *Digitaria sanguinalis* e *Youngia japonica*.

A massa seca total de plântulas foi reduzida drasticamente ao elevar a concentração do extrato, a partir de 2 % (Fig. 1d). O ponto de mínima resposta para a massa seca total foi observado na concentração 5,5 %. Em relação à concentração zero, houve redução de 86 % na alocação



Figs. 1a-d. Primeira contagem de germinação (PC), germinação (G). **a.** índice de velocidade de germinação; **b.** comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz primária (CPR); **c.** e massa seca total; **d.** de plântulas de alface sob ação de diferentes concentrações do extrato de *C. bonariensis*, provenientes do teste de germinação (significativo a 5 %*).

de matéria seca de plântulas submetidas à concentração 2 %. A redução do acúmulo de matéria seca pode estar relacionada ao efeito do extrato na alteração na atividade das enzimas hidrolíticas (Muniz *et al.* 2007).

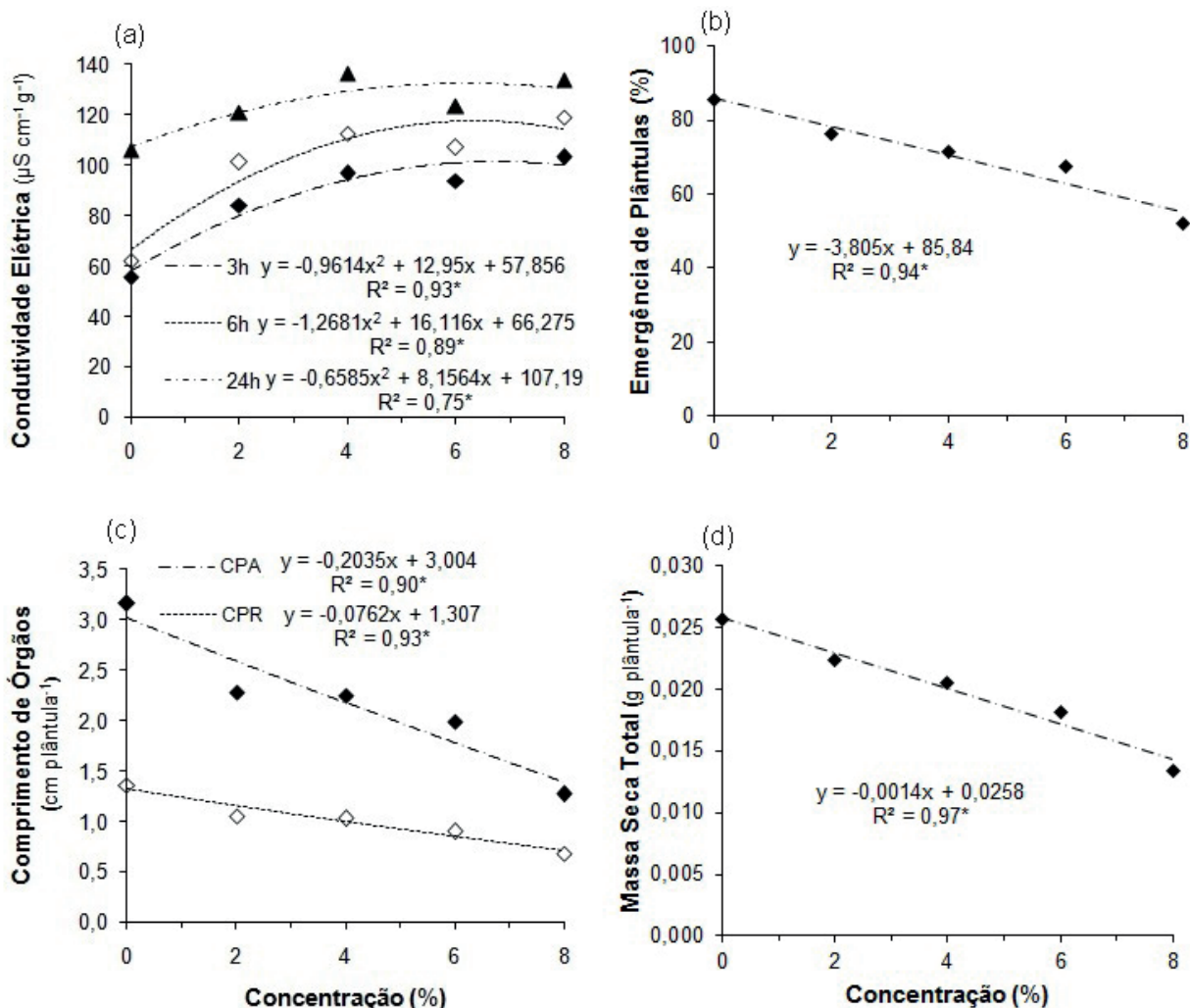
Estudos têm demonstrado a ação tóxica de extratos sobre a massa seca de plântulas. Carmo *et al.* (2007), ao realizarem estudo com extratos de folhas e de cascas de tronco de *Ocotea odorifera*, verificaram a redução da massa seca total de plântulas de *Sorghum bicolor*, indiferentemente da concentração. Tur *et al.* (2012), observaram que extratos aquosos de folhas de *Dalbergia ecastaphilum* reduzem a massa seca total de plântulas, na concentração de 8 %.

A condutividade elétrica, indiferentemente do tempo de embebição, aumentou até a concentração de 8 % do extrato (Fig. 2a). Os pontos de máxima resposta ocorreram para 3; 6 e 24 horas de embebição nas concentrações de 6,7; 6,3 e 6,2 %, respectivamente. Sementes avaliadas após 3; 6 e 24 horas de embebição apresentaram, respectivamente, maior lixiviação de eletrólitos em nível de 46,3; 47,7 e

de 25,9 % na concentração de 8 %, comparativamente a concentração zero. O aumento da condutividade elétrica é indicativo da redução da capacidade de reorganização das membranas celulares (Peske *et al.* 2012), aumentando a liberação de eletrólitos para o meio. Tais resultados estão de acordo com os encontrados por Aumonde *et al.* (2012), ao analisarem a ação do extrato de folhas *Zantedeschia aethiopica* sobre sementes de alface.

A elevação nos valores de condutividade elétrica podem manter relação com a redução de valores do índice de velocidade de germinação e primeira contagem de germinação, para as mesmas concentrações do extrato de *C. bonariensis*. Isto porque, estes atributos do vigor das sementes, estão relacionados com alterações na fluidez e permeabilidade das membranas celulares (Abu-Romman *et al.* 2010, Hussain & Reigosa 2011).

A emergência de plântulas em casa de vegetação foi reduzida conforme o aumento da concentração do extrato (Fig. 2b), alcançando na maior concentração, a redução de 39,2 % em relação à concentração zero. O ponto de



Figs. 2a-d. Condutividade elétrica de sementes após 3, 6 e 24 horas. **a.** emergência de plântulas em casa de vegetação; **b.** comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz primária (CPR); **c.** massa seca total; **d.** de plântulas de alface sob ação de diferentes concentrações do extrato de *C. bonariensis*, provenientes do teste de emergência de plântulas (significativo a 5 %*).

mínima resposta para a emergência de plântulas ocorreu na concentração de 8 % do extrato. Tais resultados podem ser atribuídos a ação dos aleloquímicos, que atuam diretamente nos processos de degradação celular e na produção de espécies reativas de oxigênio (Qian *et al.* 2009), afetando o vigor das sementes. Silva *et al.* (2011) não verificaram diferenças na emergência de plântulas de alface, tomate e de cebolinha submetidas a ação de diferentes concentrações do extrato *Dicranopteris flexuosa*.

O comprimento de parte aérea e de raiz primária, em plântulas provenientes do teste de emergência em casa de vegetação foi decrescente com o aumento da concentração do extrato (Fig. 2c). O ponto de mínima resposta, tanto para o comprimento de parte aérea quanto para o parâmetro comprimento de raiz primária foi na concentração de 8 %. Em relação à concentração zero, houve redução de 59,8 % e de 50 % no comprimento de parte aérea e raiz primária, respectivamente. Resultados similares foram obtidos por Maraschin-Silva & Aqüila (2006), onde os autores verificaram que o extrato de *Psychotria leiocarpa* nas maiores concentrações, reduz o comprimento de parte aérea de plântulas de alface. Silveira *et al.* (2012) ao avaliarem o efeito do extrato aquoso da *Mimosa tenuiflora* em sementes e plântulas de alface, observaram que quanto maior a concentração do extrato, menor o comprimento de parte aérea.

A massa seca total de plântulas provenientes do teste de emergência, assim como daquelas obtidas do teste de germinação, apresentou redução (Figs. 2d; 1d). O ponto de mínima resposta foi na concentração de 8 % e houve diminuição de 89 % na massa seca de plântulas expostas à concentração de 8 %, comparativamente à concentração zero. O efeito tóxico dos aleloquímicos pode ocorrer sobre fotossíntese, pela alteração no teor de clorofila ou pela redução na absorção de fótons (Hussain & Reigosa 2011), refletindo no acúmulo de matéria seca. Contudo, Oliveira *et al.* (2014) ao analisarem o potencial de extratos aquosos foliares de *Mimosa tenuiflora* sobre plântulas de alface, observaram aumento na massa seca de plântulas de alface, em concentrações superiores a 50 %.

O teor de peróxido de hidrogênio, a peroxidação lipídica e a atividade de enzimas antioxidantes, ajustaram-se a tendência quadrática com elevados coeficientes de determinação ($R^2 \leq 0,91$) (Fig. 3).

O teor de peróxido de hidrogênio foi crescente com a concentração do extrato (Fig. 3a), assim como, a peroxidação lipídica (Fig. 3b), atingindo um aumento de 33,5 % e 33,8 %, respectivamente, na concentração de 8 % quando comparado com a concentração zero. O ponto de mínima resposta para o peróxido de hidrogênio foi verificado na concentração de 2,5 %, e o ponto de máxima resposta para a peroxidação lipídica foi observado na concentração de 8 %. O aumento da concentração de peróxido de hidrogênio afeta a permeabilidade dos canais de cálcio, resultando no aumento de cálcio livre no citosol (Mori & Schroeder 2004), causando danos às células vegetais. A elevação dos níveis de H_2O_2 em tecidos vegetais pode estimular a elevação da

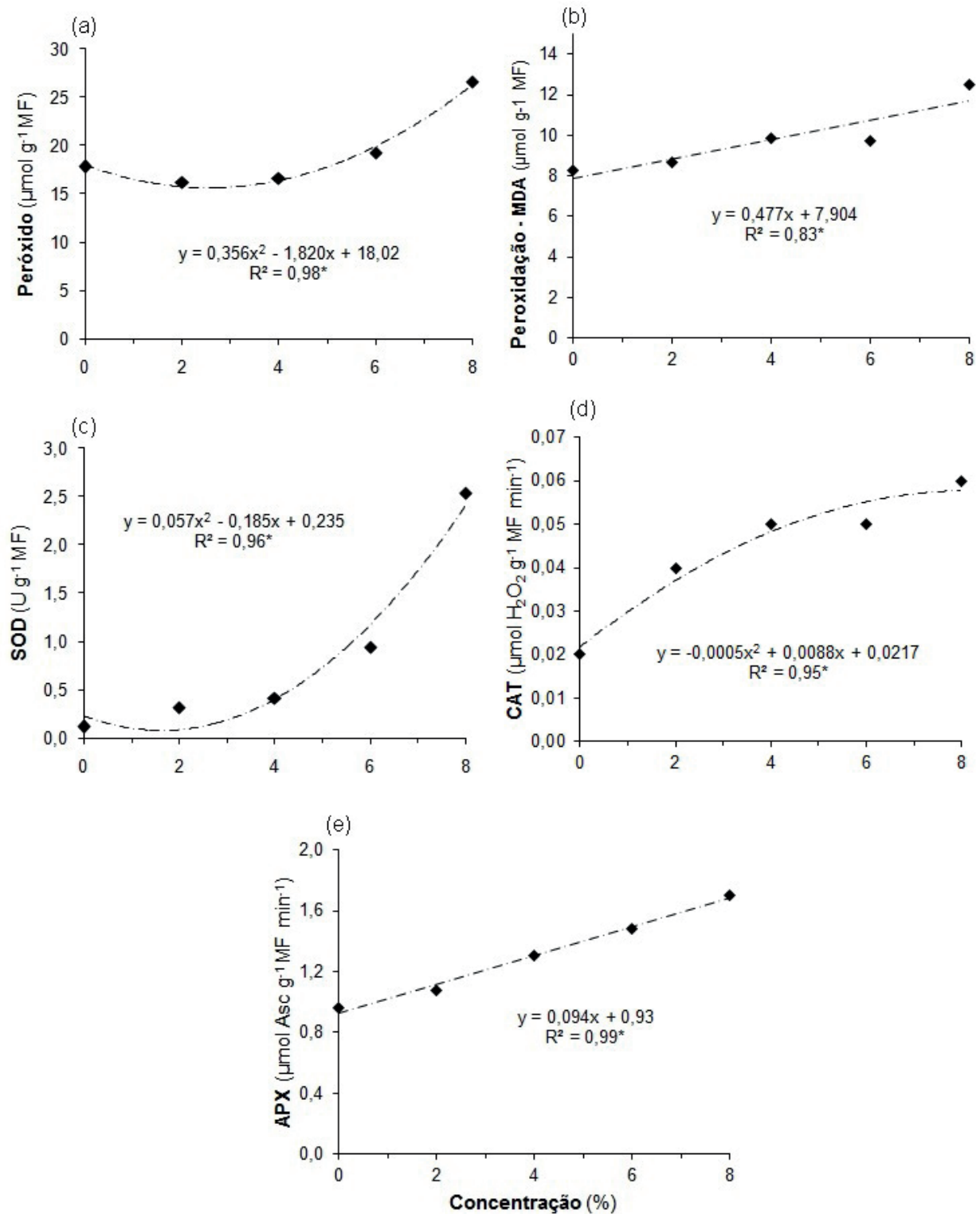
atividade de enzimas antioxidantes e seu acúmulo pode conduzir ao estresse oxidativo (Omezzine *et al.* 2014).

A atividade da enzima superóxido-dismutase (SOD) aumentou de forma marcante a partir da concentração de 4 % do extrato, apresentando acréscimo até a maior concentração (Fig. 3c). O ponto de mínima resposta foi observado para este parâmetro na concentração de 1,6 %, ocorrendo aumento de 71,4; 87,2 e de 95,2 % para as concentrações 4; 6; e 8 % respectivamente, quando comparadas a concentração zero. Contudo, a atividade da enzima catalase (CAT) foi elevada a partir da concentração de 2 %, atingindo a máxima atividade em plântulas sob ação da concentração de 8 % (Fig. 3d). Verificou-se aumento de 50; 60; 60 e de 68 %, para as concentrações 2; 4; 6 e 8 %, respectivamente, quando comparadas a concentração zero. O ponto de máxima verificado para a enzima catalase foi na concentração de 8 %. A enzima ascorbato-peroxidase (APX) apresentou incremento até a maior concentração do extrato (Fig. 3e). Observou-se nas concentrações 2; 4; 6; e 8 % um aumento de 12,5; 26,7; 35 % e de 43,5 %, comparado com a concentração zero. O ponto de máxima para esse parâmetro foi determinado na concentração de 8 %.

O aumento das concentrações do extrato de *C. bonariensis* proporcionou um ambiente mais estressante às sementes e plântulas de alface, tendo resultado nos maiores teores de peróxido de hidrogênio em plântulas (Fig. 3a) e na maior peroxidação lipídica (Fig. 3b). A elevação nos teores de peróxido de hidrogênio, provavelmente, conduziu à elevação da atividade das enzimas superóxido-dismutase, catalase e ascorbato-peroxidase (Figs. 3c, 3d e 3e). Estas enzimas, são responsáveis pela defesa das células contra os radicais livres gerados sob condições de estresse (Carneiro *et al.* 2011).

Diversos autores têm relatado incremento na atividade das enzimas CAT, SOD e APX em resposta ao estresse imposto pela ação de extratos vegetais (Singh *et al.* 2009; Singh *et al.* 2013). A enzima superóxido-dismutase promove a dismutação de radicais superóxido a peróxido de hidrogênio (Ahmed *et al.* 2009), enquanto, a catalase degrada o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular e enzima ascorbato-peroxidase, em água (Gill & Tuteja 2010). Tal ação ocorre visando a detoxificação dos tecidos, contudo, deve haver uma relação de equilíbrio entre a síntese e a degradação de radicais livres, visando evitar o estresse oxidativo (Li *et al.* 2010). Neste trabalho, o aumento na atividade das enzimas antioxidantes não foi eficaz para reverter a o efeito tóxico do extrato.

Nas condições testadas, o extrato de *C. bonariensis* possui efeito fitotóxico em sementes e plântulas de alface. As maiores concentrações do extrato (6 e 8 %) proporcionam maior inibição da germinação e do crescimento inicial de plântulas. O aumento da concentração do extrato resulta na elevação da condutividade elétrica em sementes, dos níveis de peróxido de hidrogênio, da peroxidação lipídica e das enzimas superóxido-dismutase, catalase e ascorbato-peroxidase.



Figs. 3a-e. Peróxido de hidrogênio. **a.** peroxidação lipídica; **b.** atividade das enzimas: superóxido-dismutase (SOD); **c.** catalase (CAT); **d.** ascorbato-peroxidase (APX); **e.** em plântulas de alface provenientes do teste de germinação em condições laboratoriais sob ação de diferentes concentrações do extrato de *C. bonariensis* (significativo a 5% *).

REFERÊNCIAS

- Abu-romman, S., Shatnawi, M. & Shibli, R. 2010. Allelopathic Effects of spurge (*Euphorbia hierosolymitana*) on wheat (*Triticum durum*). American Eurasia Journal of Agricultural & Environmental Sciences 7(3):98-302.
- Ahmed, C.B., Rouina, B., Sensoy, S., Boukhris, M. & Abdallah F.B. 2009. Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. Environmental and Experimental Botany 67(1):345-352.
- Aumonde, T.Z., Martinazzo, E.G., Borella J., Pedó, T., Amarante, L., Villela, F.A. & Moraes D. M. 2012. Alterações fisiológicas em sementes e metabolismo antioxidativo de plântulas de alface expostas à ação do extrato das folhas de *Zantedeschia aethiopica* Spreng. Interciencia 37(11):845-851.
- Berg, M.V.D. & Klant, E. 1997. Variabilidade espacial de características de solos na região do Planalto Médio, RS: I. análise da variância por amostragem aninhada. Revista Brasileira de Ciência do Solo 21(3):393-399.
- Bhowmik, P.C. & Bekech, M.M. 1993. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed production, emergence, and distribution in no-tillage and conventional tillage corn (*Zea mays*). Agronomy 1(1):67-71.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. Regras para Análise de Sementes. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária/Assessoria de Comunicação Social. 399 p.
- Cakmak, I. & Horst, W.J. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). Physiologia Plantarum 83(1):463-468.
- Carmo, F.M.S., Borges, E.E.L. & Takaki, M. 2007. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer. Acta Botanica Brasilica 21(1):697-705.
- Carneiro, M.M.L.C., Deuner, S., Oliveira, P.V., Teixeira, S.B., Sousa, C. P., Bacarin, M.A. & Moraes, D.M. 2011. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. Revista Brasileira de Sementes 33(4):752-761.
- Carvalho, W.P., Carvalho, G.J., Neto, D.O.A. & Teixeira, L.G.V. 2014. Alelopatia de extratos de adubos verdes sobre a germinação e crescimento inicial de alface. Bioscience Journal 30(1):1-11.
- Chapla, T.E. & Campos, J.B. 2010. Allelopathic evidence in exotic guava (*Psidium guajava* L.). Brazilian Archives of Biology and Technology 53(6):1359-1362.
- Chon, S.U., Nelson, C.J. & Coutts, J.H. 2006. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) autotoxicity: current status. Allelopathy Journal 18(1):57-80.
- Cipollini, D., Stevenson, R. & Cipollini, K. 2008. Contrasting effects of allelochemicals from two invasive plants on the performance of a nonmycorrhizal plant. International Journal of Plant Sciences 169(3):371-375.
- Dorning, M. & Cipollini, D. 2006. Leaf and root extracts of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, inhibit seed germination of three herbs with no autotoxic effects. Plant Ecology 184(2):287-296.
- Forman, H.J., Maiorino, M. & Ursini, F. 2010. Signaling functions of reactive oxygen species. Biochemistry 49(1):835-842.
- Giannopolitis C.N. & Ries S.K. 1997. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology 59(1):309-314.
- Gill, S.S. & Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48(12):909-930.
- Hoffmann, C.E.F., Neves, L.A.S., Bastos, C.F. & Wallau, G.L. 2007. Atividade alelopática de *Nerium Oleander* L. e *Dieffenbachia picta* schott em sementes de *Lactuca Sativa* L. e *Bidens pilosa* L. Revista de Ciências Agroveterinárias 6(1):11-21.
- Hu, G. & Zhang, Z.H. 2013. Aqueous tissue extracts of *Conyza Canadensis* inhibit the germination and shoot growth of three native herbs with no autotoxic effects. Planta Daninha 31(4):69-811.
- Hussain, M.I. & Reigosa, M. J. 2011. Allelochemical stress inhibits growth, leaf water relations, PSII photochemistry, non-photochemical fluorescence quenching, and heatenergy dissipation in three C3 perennial species. Journal of Experimental Botany 62(13):453-454.
- Inderjit, S.T.R., Callaway, R.M., Pollock, J.L. & Kaur, J. 2008. Allelopathy and plant invasions: traditional, congeneric, and bio-geographical approaches. Biological Invasions 10(3):875-890.
- Khaliq, A., Matloob, A., Khan, M.B. & Tanveer, A. 2013. Differential suppression of rice weeds by allelopathic plant aqueous extracts. Planta Daninha 31(1):21-28.
- Kissmann, K.G. & Groth, D. 1999. Plantas infestantes e nocivas. Editora Basf, São Paulo. 978 p.
- Krzyzanowski, F.C., França Neto, J.B. & Henning, A.A. 1991. Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. Informativo Abrates 1(2):15-50.
- Krzyzanowski, F.C., Vieira, R.D. & França Neto, J.B. 1991. Vigor de sementes: Conceitos e testes. Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes – Abrates, Londrina. 218 p.
- Lamego, F.P., Kaspar, T.E., Ruchel, Q., Gallon, M., Basso, C.J. & Santi, A.L. 2013. Manejo de *Conyza bonariensis* resistente ao glyphosate: coberturas de inverno e herbicidas em pré-semeadura da soja. Planta Daninha 31(2):433-442.
- Li, Z.H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C.D. & Jiang, D.A. 2010. Phenolics and plant allelopathy. Molecules, 15(12):8933-8952.
- Macias, F.A., Molinillo, J.M.G., Varela, R.M. & Galindo, J.C.G. 2007. Allelopathy: a natural alternative for weed Control. Pest Management Science 63(4):327-348.
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Science 2(1):176-177.
- Maraschin-Silva, F. & Aquila, M.E.A. 2006. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). Acta Botanica Brasilica 20(1):61-69.
- Mori, I.C. & Schoroeder, J.I. 2004. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. Plant Physiology 135(2):702-708.
- Muniz, F.R., Cardoso, M.G., Von Pinho, E.V.R. & Villela, M. 2007. Qualidade fisiológica de sementes de milho, feijão, soja e alface na presença de extrato de tiririca. Revista Brasileira de Sementes 29(2):195-204.
- Nakano, Y. & Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology 22(1):867-880.
- Nery, M.C., Carvalho, M.L.M., Nery, F.C. & Pires, R.M.O. 2013. Potencial alelopático de *Raphanus sativus* L. var. oleiferus. Informativo Abrates 23(1):122-130.
- Oliveira, A.K.M., Matias, R., Lopes, S.S. & Fontoura, F.M. 2014. Allelopathy and influence of leaves of *Palicourea rigida* (Rubiaceae) on seed germination and seedling formation in lettuce. Bioscience Journal 30(2):938-947.
- Omezzine, F., Ladhari, A. & Haouala, R. 2014. Physiological and biochemical mechanisms of allelochemicals in aqueous extracts of diploid and mixoploid *Trigonella foenum-graecum* L. South African Journal of Botany 93(1):167-178.
- Panda, S.K. & Khan, M.H. 2009. Growth, oxidative damage and antioxidant responses in greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term salinity stress and its recovery. Journal of Agronomy and Crop Science 195(1):442-454.
- Paula, J.M., Vargas, L., Agostinetto, D. & Nohatto, M.A. 2011. Manejo de *Conyza bonariensis* resistente ao herbicida glyphosate. Planta Daninha 29(1):217-227.
- Peres, M.T.L.P., Simionatto, E., Hess, S.C., Bonani, V.F.L., Candido, A.C.S. & Castelli, C. 2009. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel (Polypodiaceae). Química Nova 32(4):897-901.
- Pisula, N.L. & Meiners, S.J. 2010. Relative allelopathic potential of invasive plant species in a young disturbed woodland. Journal of the Torrey Botanical Society 137(1):81-87.
- Qian, H., Xu, X., Chen, W., Jiang, H., Jin, Y. & Liu, W. 2009. Allelochemical stress causes oxidative damage and inhibition of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. Chemosphere 75(3):368-375.
- Silva, V.S., Cândido, A.C.S., Muller, C., Laura, V.A., Faccenda, O., Simionatto, E., Hess, S.C. & Peres, M.T.L.P. 2011. Potencial fitotóxico de *Dicranopteris flexuosa* (Schrad.) Underw. (Gleicheniaceae). Acta Botanica Brasilica 25(1):95-104.

- Silveira, P.F., Maia, S.S.S. & Coelho, M.F.B. 2012. Potencial alelopático do extrato aquoso de cascas de jurema preta no desenvolvimento inicial de alface. *Revista Caatinga* 25(1):20-27.
- Singh, A., Singh, D. & Singh, N.B. 2009. Allelochemical stress produced by aqueous leachate of *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. *Plant Growth Regulation* 58(1):163-171.
- Singh, N.B., Sunaina, K.Y. & Amist, N. 2013. Phytotoxic effects of cinnamic acid on cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata). *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* 9(2):307-317.
- Thorpe, A.S. Thelen, G.C. Diaconu, A. & Callaway, R.M. 2009. Root exudate is allelopathic in invaded community but not in native community: field evidence for the novel weapons hypothesis. *Journal of Ecology* 97(4):641-645.
- Tur, C.M., Martinazzo, E.G., Aumonde, T.Z. & Villela, F.A. 2012. Atividade alelopática de extratos aquosos de folhas de rabo-de-bugio sobre a germinação e o crescimento inicial de plântulas de alface. *Revista brasileira de Biociências* 10(4):521-525.
- Velikova, V., Yordanov, I. & Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Science* 151(1):59-66.
- Wu, A.P., Yu, H., Gao, S.O., Huang, Z.Y., He, W.M., Miao, S.L. & Dong, M. 2009. Differential belowground allelopathic effects of leaf and root of *Mikania micrantha*. *Trees Structure and Function* 23(1):11-17.