

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E
MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

EZEQUIEL MARÇAL ZANCHETTI DA LUZ

POTENCIAL ALELOPATICO DE *Inga marginata* W. E SEUS EFEITOS SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE MILHO: A VIABILIDADE
PARA SISTEMAS AGROFLORESTAIS

CASCATEL-PR

MAIO/2018

EZEQUIEL MARÇAL ZANCHETTI DA LUZ

POTENCIAL ALELOPATICO DE *Inga marginata* W. E SEUS EFEITOS SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE MILHO: A VIABILIDADE
PARA SISTEMAS AGROFLORESTAIS

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais.

Área de Proporção: Ciências Ambientais

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Maria
Teixeira Fortes

Co-orientadora: Profa. Dra. Jaqueline
Malagutti Corsato

CASCAVEL-PR

MAIO/2018

Dedico este trabalho a meus pais,
Paulino e Licelda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida...

A meus pais, por sempre terem dado todo suporte e apoio, dando-nos forças para não desistir de nossos sonhos. A esses que; se dedicaram, abdicaram de tempo e de muitos projetos pessoais para que meus irmãos e eu tivéssemos a oportunidade de estudar e construir nossos projetos sobre aquilo que acreditamos. Enfim, se pudesse escrever sobre tudo que sou grato; certamente sairia um livro rsrs... Obrigado, mãe e pai por tudo!

Aos meus irmãos por toda parceria e companheirismo. Como sempre foi dito; os irmãos mais velhos devem dar o exemplo para os mais novos. Vocês com certeza serviram durante toda a minha formação como referência, algumas a serem seguidas, outras não rsrs... Obrigado por tudo!

A minha orientadora Professora Andréa por ter me aceitado no laboratório e me proporcionado essa oportunidade. Agradeço pelos dois anos de dedicação nas orientações e ensinamentos, que com certeza foram fundamentais para o meu crescimento e aperfeiçoamento profissional. Obrigado por ter confiado no meu trabalho e por toda paciência e compreensão. Levarei para minha carreira o exemplo de profissionalismo e respeito que tem com a pesquisa...

A minha co-orientadora Professora Jaqueline pela dedicação que teve com a minha pesquisa. Agradeço pela orientação e por tudo que me ensinou nesses dois anos; por estar sempre junto tirando todas as dúvidas, ensinando a pesquisar e realizar os experimentos do laboratório; nas interpretações dos dados. Obrigado pelo exemplo profissional e pela amizade...

Aos colegas de laboratório pela parceria fechada durante esses dois anos, que com certeza vou lembrar para sempre, aprendi muito com todos vocês. Pela dedicação e responsabilidade que sempre tivemos uns com os outros na realização dos experimentos laboratoriais. Obrigado pela amizade e companheirismo...

A Ivone por todo apoio técnico, pela dedicação e responsabilidade que teve com a pesquisa. Obrigado por sempre ter ajudado na solução dos problemas técnicos no laboratório e providenciar os reagentes que necessitávamos...

Enfim, obrigado a todos que contribuíram no desenvolvimento desse projeto...

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
CAPITULO 1	8
INTRODUÇÃO	10
MATERIAL E MÉTODOS	11
Teste de germinação em laboratório	11
Desenvolvimento inicial	11
Análise enzimática.....	12
Delineamento experimental e análise estatística.....	12
RESULTADOS	12
Germinação	12
Crescimento inicial.....	12
Análise enzimática.....	13
DISCUSSÃO	15
Anexo 1	19
CAPITULO 2	22
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1. Emergência em casa de vegetação	28
2.2. Crescimento inicial em casa de vegetação	29
2.3. Análise enzimática	30
2.4. Delineamento experimental e análise estatística	31
3. RESULTADOS	32
3.1. Emergência em casa de vegetação	32
3.2. Crescimento inicial	33
3.3. Análise enzimática	34
4. DISCUSSÃO.....	36
5. REFERÊNCIAS	39
Anexo II	44

RESUMO

A presente dissertação foi dividida em dois capítulos. No primeiro o objetivo foi avaliar em laboratório o efeito alelopático do extrato aquoso das folhas de ingá, sobre germinação, desenvolvimento inicial e atividade antioxidante de plântulas de milho. No segundo capítulo o objetivo foi avaliar em casa de vegetação o efeito alelopático do ingá sobre a emergência, crescimento inicial e resposta antioxidante de plântulas de milho. Para o efeito alelopático sobre a germinação, analisou-se a porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, tempo médio de germinação, frequência e sincronização da germinação das sementes de milho expostas as diferentes proporções do extrato aquoso das folhas secas de ingá. Para o efeito sobre o desenvolvimento inicial, analisamos o peso de massa seca e o comprimento médio de raízes e partes aéreas das plântulas de milho. Também foi quantificado a atividade das enzimas envolvidas no estresse oxidativo, superóxido dismutase, catalase e peroxidase, além da peroxidação lipídica, medida pelos teores de malondialdeído. Para o teste de emergência em casa de vegetação os tratamentos também foram constituídos pelas diferentes proporções do extrato aquoso de ingá, sendo avaliada a porcentagem de emergência, tempo médio de emergência, índice de velocidade de emergência, sincronização e frequência relativa. No teste de crescimento inicial em casa de vegetação foram obtidos uma testemunha e o tratamento dois que recebeu cobertura do solo com pó das folhas secas de ingá, avaliando a massa seca de parte aérea, massa seca de raiz, comprimento médio de parte aérea e comprimento médio de raiz. Para avaliação do estresse oxidativo sobre crescimento inicial foram quantificadas as enzimas, superóxido dismutase, peroxidase e catalase, além da peroxidação lipídica pelos níveis de malondialdeído. Em laboratório o extrato aquoso das folhas de ingá não interferiu nas variáveis de germinação do milho, no entanto, causou inibição do comprimento médio das raízes, inibição da atividade da catalase na raiz e parte aérea e aumentou os teores de MDA radicular. Em casa de vegetação não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos para as variáveis avaliadas na emergência e crescimento inicial das plântulas de milho. No entanto, registramos que houve maior expressão da catalase tanto em raiz como em parte aérea e menor peroxidação lipídica na parte aérea das plântulas submetidas ao tratamento dois. Apesar de ser registrado efeito alelopático prejudicial em laboratório, o extrato não prejudicou o desenvolvimento das plântulas de milho em casa de vegetação. Sendo assim, propomos que o consórcio entre as espécies em SAFs é viável.

PALAVRAS CHAVE: alelopatia; crescimento inicial; emergência; estresse oxidativo; enzimas antioxidantes; Sistema agroflorestal.

ALLELOPATHY POTENTIAL OF *Inga marginata* W. AND ITS EFFECTS ON MAIZE DEVELOPMENT: THE VIABILITY FOR AGROFLORESTATIC SYSTEMS

ABSTRACT

In the first chapter the objective was to evaluate in laboratory the allelopathic effect of the aqueous extract of ingá leaves on germination, initial development and antioxidant activity of maize seedlings and in the second chapter the objective was to evaluate in greenhouse the allelopathic effect of the ingá on the emergency, initial growth and antioxidant response of corn seedlings. For the allelopathic effect on germination, we analyzed the percentage of germination, germination speed index, mean germination time, frequency and synchronization of the germination of the maize seeds exposed to the different proportions of the aqueous extract of the dried leaves of ingá. For the effect on the initial development, we analyzed the weight of the dry mass and the average length of the roots and aerial parts of the maize seedlings. The enzymes involved in oxidative stress, Superoxide dismutase, Catalase and Peroxidase, as well as lipid peroxidation, measured by the levels of malondialdehyde (MDA), were also quantified. For the greenhouse emergency test the treatments were also constituted by the different proportions of the aqueous extract of ingá, being evaluated the percentage of emergency, average time of emergency, index of emergency speed, synchronization and relative frequency. In the initial greenhouse growth test, a control was obtained and the treatment two that received ground cover with dry leaves of ingá, evaluating the aerial part dry mass, root dry mass, average length of aerial part and length root mean. For the evaluation of oxidative stress on initial growth, enzymes, superoxide dismutase, peroxidase and catalase, besides lipid peroxidation by malondialdehyde levels were quantified. The aqueous extract of the ingá leaves did not interfere in the germination variables of the corn, however, caused inhibition of root mean length, inhibited root and shoot catalase activity and increased root MDA contents. There were no statistical differences between treatments for the variables evaluated in the emergence and initial growth of corn seedlings in greenhouse. However, we observed that there was greater expression of catalase in both root and aerial part and lower lipid peroxidation in the aerial part of the seedlings submitted to treatment two. In this way we propose that the consortium among the species in Saf's is viable.

KEYWORDS: allelopathy; initial growth; emergency; oxidative stress; antioxidant enzymes; agroforestry system.

CAPITULO 1

ALTERAÇÕES MORFISIOLOGICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM
PLÂNTULAS DE MILHO SUBMETIDAS AO EXTRATO AQUOSO DE *Inga*
marginata W.

O artigo segue as normas de formatação da
revista Floresta ISSN 1982-4688. Anexo I
do capítulo 1.

ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM PLÂNTULAS DE MILHO SUBMETIDAS AO EXTRATO AQUOSO DE *Inga marginata* W.

Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz^{*1}, Erly Carlos Porto², Guilherme Garcia Rodrigues², Maiara Iadwizak Ribeiro², Jaqueline Malagutti Corsato², Andréa Maria Teixeira Fortes².

1. *Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais. Cascavel, Paraná, Brasil – emzluz@gmail.com

2. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais. Cascavel, PR, Brasil. andrea.fortes@unioeste.br; jaque_corsato@hotmail.com; erly.carlos@gmail.com; guilhermegarciax@gmail.com; maiara_maa@hotmail.com.

Resumo

Conhecer as interações entre as espécies que constituem um sistema agroflorestal é um dos pontos fundamentais para o desenvolvimento deste tipo de cultivo, visto que; se houver efeito alelopático negativo sobre a espécie cultivada, pode haver prejuízos na produção. Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito alelopático do extrato aquoso das folhas de ingá, sobre germinação, desenvolvimento inicial e atividade antioxidante de plântulas de milho, verificando assim, a viabilidade do consórcio entre as espécies. Para avaliar o efeito alelopático sobre a germinação, analisou-se: a porcentagem de germinação (PG), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG), frequência e sincronização da germinação. Para o efeito sobre o desenvolvimento inicial, analisamos o peso de massa seca e o comprimento médio de raízes e partes aéreas das plântulas de milho. Também foi quantificado a atividade das enzimas envolvidas no estresse oxidativo, Superóxido dismutase, Catalase e Peroxidase, além da peroxidação lipídica, medida pelos teores de malondialdeído (MDA). O extrato aquoso das folhas de ingá não interferiu nas variáveis de germinação do milho, no entanto; causou inibição do comprimento médio das raízes, inibiu a atividade da Catalase de raiz e parte aérea e aumentou os teores de MDA radicular. Portanto foi possível concluir que o extrato aquoso das folhas de ingá induzem ao estresse oxidativo em plântulas de milho, causando redução do crescimento de raiz, não sendo encorajado o consórcio entre as duas espécies em SAFs.

Palavras-chave: Sistema agroflorestal, estresse oxidativo, alelopatia, interação alelopática.

Abstract

Knowing the interactions between species that constitute an agroforestry system is one of the fundamental points for the development of this type of crop, since if there is a negative allelopathic effect on the cultivated species, there may be losses in production. In this way, the present work aimed to evaluate the allelopathic effect of the aqueous extract of the ingá leaves, on germination and initial development of maize, through induction to oxidative stress, thus verifying the viability of the consortium among the species. In order to evaluate the allelopathic effect on germination, germination percentage (PG), germination speed index (IVG), mean germination time (TMG), germination frequency and synchronization were analyzed. For the effect on the initial development, we analyzed the dry weight weight and the average length of roots and aerial parts of maize seedlings. The enzymes involved in oxidative stress, Superoxide dismutase, Catalase and Peroxidase, as well as lipid peroxidation, measured by the levels of malondialdehyde (MDA), were also quantified. The aqueous extract of the ingá leaves did not interfere in the germination variables of the corn, however, caused inhibition of root mean length, inhibited root and shoot catalase activity and increased root MDA contents. Therefore, it was possible to conclude that the aqueous extract of the ingá leaves induce the oxidative stress in corn seedlings, causing a reduction of the root growth, and the consortium between the two species in Saf's was not encouraged.

Keywords: Agroforestry system, oxidative stress, allelopathy, allelopathic interaction.

INTRODUÇÃO

Dentre as modalidades de cultivo que são adotadas nos últimos anos para minimizar os impactos ambientais causados pela agricultura estão os sistemas agroflorestais. Esse tipo de sistema visa o consórcio das espécies agrícolas como o milho, com espécies arbóreas, para aumentar as interações ecológicas e o aporte de matéria orgânica no solo, proporcionando um aumento da fertilidade natural da matriz, além de evitar a sua perda pela erosão (EWERT et al., 2016).

As espécies arbóreas da família Fabaceae, como o *Inga marginata* W., são visadas para esse tipo de cultivo para fins de adubação verde a partir da fixação biológica de nitrogênio e deposição da matéria orgânica oriunda das podas (MATTAR et al., 2013). Essa espécie é nativa da mata atlântica, com ampla distribuição geográfica, tendo registros em diversas formações florestais, como floresta ombrófila densa, ombrófila mista e estacional semidecidual (POSSETTE; RODRIGUES, 2010).

No entanto, apesar de o ingá já ser utilizado para fins de adubação verde em SAFs, não há registros na literatura acerca das suas interações fisiológicas sob o desenvolvimento de outras espécies. Destaca-se que a utilização de uma espécie inadequada no desenvolvimento desses sistemas pode trazer prejuízos para a produção agrícola, uma vez que as espécies vegetais podem interferir no desenvolvimento de outras plantas ou organismos, através de compostos secundários liberados no ambiente, em um processo denominado alelopatia (HABERMANN et al., 2016; CORSATO et al., 2016).

Os compostos alelopáticos podem ser liberados no ambiente por lixiviação, decomposição e ou exsudatos radiculares e, assim, interferir no desenvolvimento vegetal, afetando a germinação ou o crescimento inicial de sementes e plântulas. Dentre os efeitos observados, que podem ser atribuídos a esses compostos, está a indução ao estresse oxidativo que gera diversos danos ao organismo, causado pelo desequilíbrio nas concentrações internas de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ALMEIDA et al., 2008; SILVA et al., 2016).

As EROs são geradas naturalmente nos organismos a partir da respiração celular ou outros processos metabólicos e o estímulo à sua produção acontece por diversos mecanismos. Dentre eles, o bloqueio da cadeia transportadora de elétrons, onde os elétrons ficam livres e reagem facilmente com o O_2 formando radical superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, por sua vez, pode reagir gerando radicais mais reativos como o hidroxil ($OH^\cdot$). Os radicais podem afetar a permeabilidade de membranas, causando danos ao DNA e outras estruturas, como a membrana plasmática (GNAZDOWSKA; BOGATEK, 2005; BARBOSA et al., 2014).

Para proteger o organismo contra a ação dos radicais livres, enzimas como a superóxido dismutase (SOD), são geradas para catalisar o O_2^- a H_2O_2 , constituindo a primeira linha de defesa da planta. Já os níveis de H_2O_2 são controlados pela atividade de outras enzimas antioxidante, como a catalase (CAT) e a peroxidase (POD) que o decompõem a água e O_2 (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003).

No entanto, em eventos de estresses ambientais, como o causado pela exposição a compostos alelopáticos, podem ocorrer desequilíbrios no sistema antioxidativo, seja por concentrações muito elevadas dos radicais ou por inativação enzimática. Nesses casos, os processos de desintoxicação das EROs torna-se ineficaz, gerando o estresse oxidativo (ORACZ et al., 2007).

O dano de membrana celular ocorre principalmente pela ação do radical $OH^\cdot$, que reage com os ácidos graxos poli-insaturados através da retirada de um hidrogênio, desencadeando uma reação em cadeia que leva a destruição celular (BARBOSA et al., 2010). A peroxidação da membrana mitocondrial gera como produto, dentre outros, o malondialdeído (MDA) que pode ser quantificado para identificar o dano celular causado pela ação das EROs (GILL; TUTEJA, 2010).

Como visto anteriormente as enzimas que compõem o sistema antioxidante vegetal podem ter sua atividade específica alterada pela presença de compostos alelopáticos. Assim, esse tipo de análise constitui uma ferramenta eficaz para as pesquisas que envolvem o efeito desses compostos sobre desenvolvimento de outras espécies, tornando a análise mais precisa, tendo em vista que a maioria dos estudos com a alelopatia abordam somente a germinação e crescimento inicial.

Tendo em vista que a liberação dos aleloquímicos no ambiente pode ocorrer, também, por lixiviação e decomposição da matéria orgânica e que nos sistemas agroflorestais as folhas dos componentes arbóreos são podadas e depositadas ao solo, se essa espécie apresentar efeito alelopático negativo sobre o desenvolvimento da cultura agrícola poderá ocorrer prejuízos para a produção (MATTAR et al., 2013). Portanto, são importantes estudos que investiguem o efeito alelopático das espécies a serem utilizadas nesse tipo de sistemas.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito alelopático do extrato aquoso das folhas de *Inga marginata* sobre a germinação, crescimento inicial e atividade antioxidante de plântulas de milho, assim avaliar a viabilidade do consórcio entre as duas espécies em sistemas agroflorestais.

MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, campus de Cascavel-PR, no período de agosto de 2016 a agosto de 2017.

As folhas de Ingá foram coletadas em um fragmento de mata, localizado na região do município de Serranópolis do Iguaçu-PR, sob as coordenadas 25°38'94.81"S 53°99'58.26"W, nas proximidades do Km 05 da PR 495. Uma excisada do material vegetal foi registrada no Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Cascavel sob o registro 4138.

Após a coleta, as folhas de Ingá foram acondicionadas em estufa de circulação forçada a temperatura de 40° C, até que a massa se mantivesse constante, para a secagem total das folhas. Depois, a matéria seca foi triturada em moinho de faca tipo willye modelo star ft 50 e o pó acondicionado ao abrigo de luz e em temperatura ambiente, seguindo metodologia proposta por Mourão Júnior e Souza filho (2010).

As sementes de milho (*Zea mays* L) da variedade IPR 164 Lote: 3210090 foram obtidas no comércio local no ano de 2016.

Teste de germinação em laboratório

O material obtido após o processo de trituração foi submetido à extração aquosa. Para o teste de germinação em milho foram utilizados cinco tratamentos compostos pelas proporções do extrato aquoso do pó das folhas secas de Ingá, sendo esses, água destilada (testemunha); 2,5 %; 5,0 %; 7,5 % e 10 % p/v. Para a obtenção das diferentes proporções do extrato realizou-se o mesmo procedimento para cada tratamento. Para o extrato a 2,5 % foi dissolvido 25g de pó para 1L de água destilada, para a proporção de 5,0 % dissolveu-se 50g de pó para 1L de água destilada, para 7,5 % foi dissolvido 75g de pó para 1L de água destilada e para a proporção de 10 %, 100g de pó para 1L de água destilada. A suspensão permaneceu em repouso por um período de 4 horas e depois foi filtrada com o auxílio de um filtro de pano.

A avaliação do pH e o potencial osmótico dos extratos foi pré-requisito para prosseguir com o teste de germinação. Os valores de pH dos extratos avaliados com pHmetro MICRONAL B474 ficaram entre 6,0 e 8,0, enquanto que para o potencial osmótico medido pelo índice de refração utilizando-se de refratômetro, todos os tratamentos apresentaram valores acima de -0,0079 MPa. A partir da literatura consultada as duas variáveis foram consideradas adequadas para a germinação das sementes de milho (Souza filho & Dutra, 1998; Prates et al., 2000; Silva Jr et al., 2014).

Para cada tratamento foram realizadas 4 repetições de 25 sementes, colocadas para germinar entre 3 folhas de papel Germitest previamente autoclavados. O papel foi anteriormente umedecido com a solução referente a cada tratamento, com a quantidade de 2,5 vezes o peso do papel seco. Após esse processo, foram confeccionados rolos e colocados para germinar em câmara de germinação do tipo B.O.D, com um fotoperíodo de 12 horas luz/escuro em temperatura controlada de 25°C ± 2 (BRASIL, 2009).

A contagem de sementes germinadas foi realizada diariamente até o 7° dia, sempre no mesmo horário, sendo consideradas germinadas as sementes que apresentaram comprimento de raiz igual ou superior a 2mm (HADAS, 1977). As variáveis analisadas foram: porcentagem de germinação (PG), tempo médio de germinação (TMG) segundo Edmond e Drapala (1958), índice de velocidade de germinação (IVG) segundo Silva e Nakagawa (1995) e frequência e sincronização da germinação segundo Labouriau e Valadares (1976).

Desenvolvimento inicial

Para este experimento foram utilizadas 10 sementes de milho por repetição em cada tratamento. As sementes foram pré-germinadas em rolos de papel Germitest previamente autoclavados, umedecidos com água destilada (2,5 vezes o peso do papel seco) e mantidas em câmara de germinação do tipo B.O.D, com temperatura de 25°C±2 e fotoperíodo de 12 horas (luz/escuro), por aproximadamente três dias, até que a raiz atingisse aproximadamente 5cm de comprimento. Em seguida as plântulas foram transferidas para novos rolos de papel Germitest (autoclavados) embebidos com as diferentes proporções do extrato aquoso de folhas secas de Ingá (0; 2,5; 5,0; 7,5; 10% p/v) na proporção de 2,5 vezes o peso do papel.

Em garrafas de plástico foram adicionados 2,5 vezes o peso seco do papel germitest de solução referente a cada tratamento, onde foram acondicionados os rolos de papel com as plântulas no sentido vertical. O experimento foi mantido em câmara de germinação por um período de sete dias sob condições controladas de temperatura (25° C± 2) e fotoperíodo (12horas). A solução das garrafas foi renovada a cada 3 dias a fim de evitar a oxidação dos extratos.

Ao final dos sete dias do experimento foram realizadas as medições de comprimento médio e peso seco de raiz e parte aérea, além das análises das enzimas Catalase (CAT), Peroxidase (POD), Superóxido dismutase (SOD) e montante de malondialdeído (MDA).

Análise enzimática

A extração das proteínas solúveis foi de acordo com metodologia proposta por Kar e Misha (1976), sendo o ponto de partida para determinação e quantificação das enzimas antioxidantes SOD, POD, CAT e montante de MDA. Foi utilizado 100mg de material (raízes e parte aérea separadamente) triturado em nitrogênio líquido, homogeneizados com o auxílio de almofariz em 2 mL de tampão de extração fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹ pH 6,8. O macerado foi centrifugado a 12000 rpm por 20 minutos. A determinação das proteínas solúveis totais foi realizada pelo método de Bradford (1976).

A quantificação da atividade da CAT seguiu metodologia proposta de Azevedo et al., (1998) sendo expressa em nmol de H₂O₂ consumido min⁻¹ mg⁻¹. A quantificação da POD foi de acordo com citado por Teisseire; Guy (2000) e Corsato (2014), em μmol de purpuroilina min⁻¹. Para a enzima SOD a seguiu-se a metodologia proposta por Beauchamp; Fridovich (1971), expressa em U/mg de proteína. E a peroxidação lipídica pelo montante de MDA conforme proposto por Heath; Packer (1968) citado por Corsato 2014 e expresso em nmol g⁻¹ da massa fresca. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 4 repetições, sendo o tratamento com água destilada utilizado como testemunha e quatro proporções de extrato aquoso do pó das folhas secas de Ingá (2,5%; 5%; 7,5% e 10%). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% e quando houve diferença significativa entre os tratamentos foi realizado teste de regressão, por meio do programa Rstudio versão 3.2.4.

RESULTADOS

Germinação

Na tabela 1 está disposto o quadro de análise de variância das variáveis; porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, tempo médio de germinação e sincronização da germinação, que de acordo com o teste F não diferiram estatisticamente entre si (p>0,05). Destacamos que também não houve diferenças entre os tratamentos na frequência relativa de germinação. Isso mostra que o extrato aquoso de Ingá, além de não ter influenciado na porcentagem final de germinação das sementes de milho, também não interferiu na distribuição do processo germinativo,

Tabela 1. Quadro de análise de variância da germinação de sementes de milho expostas a diferentes proporções do extrato aquoso das folhas secas de *Inga marginata* W. PG=Porcentagem de germinação, IVG= Índice de velocidade de germinação, TMG=Tempo médio de germinação, U=Índice de sincronização.

Table 1. Analysis of variance analysis for germination of corn seeds exposed to different proportions of the aqueous extract of the dried leaves of *Inga marginata* W. PG = Germination percentage, IVG = Germination speed index, TMG = Mean germination time, U = Synchronization index.

Variáveis	Valor F	Valor p	C.V.
PG	0.69	0.60	5,32 %
IVG	2.88	0.05	5.62 %
TMG	1.72	0.19	6,69 %
U	1,32	0,30	35.86 %

Crescimento inicial

O crescimento inicial das plântulas de milho, referente a parte aérea não diferiu estatisticamente entre os tratamentos. A média para os tratamentos encontrou-se entre 6,28cm referente ao tratamento na proporção de 2,5% e 7,48cm para o tratamento na proporção de 10%. Também não foi possível registrar diferenças estatísticas entre os tratamentos para a massa seca da raiz, com variação entre 19mg referente ao tratamento na proporção de 7,5% e 22mg referente à testemunha e tratamento na proporção de 2,5%.

No entanto a massa seca da parte aérea das plântulas de milho foi estatisticamente diferente entre os tratamentos ($p < 0,05$). Verificou-se a partir do modelo de regressão de polinomial de segunda ordem, aumento da massa seca relacionado ao aumento na proporção do extrato de ingá (fig. 1A). Essa tendência de aumento foi registrada até a proporção de 7,5%, sendo observada uma curva descendente no sentido da proporção de 10%. O menor valor de MSPA foi de 23 mg para as plântulas expostas somente a água destilada e o maior para as plântulas submetidas ao extrato na proporção de 7,5% que foi de 34 mg.

Também são observadas diferenças significativas entre os tratamentos para a variável comprimento médio da raiz ($p < 0,05$), pois houve um ajuste de regressão polinomial de modelo quadrático, demonstrando que o extrato aquoso de ingá influenciou desfavoravelmente o comprimento médio da raiz das plântulas de milho. Registra-se uma diminuição do comprimento médio da raiz relacionado ao aumento da proporção do extrato (fig. 1B). O comprimento médio das raízes das plântulas do tratamento constituído somente pela água destilada foi de 29,2 cm, sendo esse o maior valor, enquanto que o menor valor foi de 10 cm, para as raízes das plântulas submetidas ao tratamento com 10% do extrato.

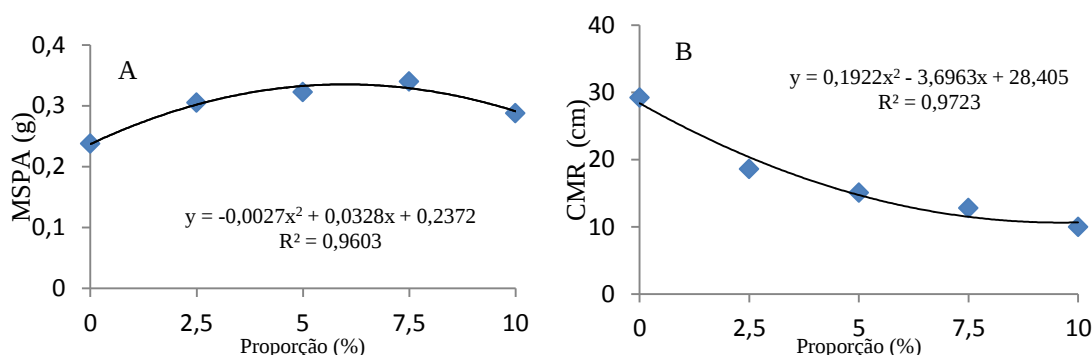


Figura 1. Gráfico da massa seca da parte aérea (MSPA) (A) e comprimento médio da raiz (CMR) (B) de plântulas de milho, submetidas as diferentes proporções do extrato aquoso das folhas de *Inga marginata* W.

Figure 1. Graph of the dry mass of the aerial part (MSPA) (A) and average length of the root (CMR) (B) of maize seedlings submitted to the different proportions of the aqueous extract of the leaves of *Inga marginata* W.

Analise enzimática

Na tabela 2 estão dispostos os valores de F e p referentes à análise de variância para a atividade enzimática e peroxidação lipídica das plântulas de milho expostas aos diferentes tratamentos. Não foram registradas diferenças estatísticas entre os tratamentos para a atividade específica das enzimas peroxidase e superóxido dismutase, tanto na parte aérea quanto na raiz ($p > 0,05$). Também não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos para a peroxidação lipídica de parte aérea das plântulas de milho ($p > 0,05$).

Tabela 2. Quadro da análise de variância para atividade enzimática e peroxidação lipídica das plântulas de milho, expostas as diferentes proporções do extrato aquoso das folhas de *Inga marginata* W. POD=atividade da peroxidase em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$. CAT= atividade da catalase em mKat mg^{-1} . SOD= atividade da superóxido dismutase em U mg^{-1} . MDA=Teores de malondialdeído em nmol/g . pa=parte aérea. r=raiz.

Table 2. Table of the analysis of variance for enzymatic activity and lipid peroxidation of corn seedlings exposed to different concentrations of the aqueous extract of leaves of *Inga marginata* W. POD = Peroxidase activity in $\mu\text{mol/min/mg}$. CAT = Catalase activity in mKat / mg . SOD = superoxide dismutase activity in U / mg . MDA = Malondialdehyde content in nmol / g . pa = aerial part. r = root.

Variáveis	Valor F	Valor p	C.V.
SODpa	0,84	0,52	36.85 %
CATpa	15,81	$2,94 \cdot 10^{-5}$	57.34 %
PODpa	1,24	0,33	35.22 %
MDApa	0,86	0,50	53.88 %
SODr*	2,5	0,086	65.82 %
CATr*	10,24	$3,33 \cdot 10^{-4}$	54.74 %
PODr	0,55	0,69	27.53 %
MDAr	16,52	$2,26 \cdot 10^{-5}$	17.27 %

*resíduos fora de normalidade a 5% de significância.

A atividade da POD na parte aérea variou de $10,31 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ para o tratamento na proporção 7,5% a $18,10 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ referente as plântulas expostas ao tratamento na proporção do extrato de 2,5%. Já para a atividade da POD em raiz os valores médios encontraram-se entre $61,76 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg min}^{-1}$ para as plântulas testemunhas e $112,99 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ para as plântulas pertencentes ao tratamento na proporção de 2,5%.

Na atividade específica da SOD na parte aérea das plântulas de milho, os valores encontram-se entre 99,75 U/mg para as plântulas do tratamento na proporção de 5% e 151,83 U/mg para as plântulas testemunhas. A atividade dessa enzima nas raízes das plântulas variou de 90,26 U/mg para as testemunhas e 222,53 U/mg para as plântulas pertencentes ao tratamento na proporção de 7,5%.

Para a peroxidação lipídica, medida pelo montante de MDA, na parte aérea das plântulas de milho, os valores encontram-se entre 4,55 nmol/g para as plântulas testemunhas e 7,81 nmol/g para aquelas submetidas ao tratamento na proporção de 7,5%.

Porém, foi registrado a partir da análise estatística que existem diferenças significativas entre os tratamentos aplicados na expressão da atividade da enzima catalase, tanto na parte aérea como na raiz ($p < 0,05$). Observamos uma relação polinomial de tendência cúbica entre a proporção do extrato aquoso de ingá e a atividade enzimática na parte aérea e de segunda ordem para atividade dessa enzima na raiz das plântulas de milho, mostrando que o extrato inibiu a atividade específica da enzima (fig.2).

Também houve diferença significativa, entre os tratamentos, nos teores de peroxidação lipídica das raízes de plântulas de milho submetidas ao extrato aquoso das folhas de ingá, registrando-se a partir de regressão de modelo ajustado a segunda ordem, uma relação entre a proporção do extrato e a peroxidação lipídica, avaliado pelos teores de malondialdeído (MDA) ($p < 0,05$). As raízes das plântulas submetidas ao tratamento constituído somente por água destilada apresentaram média de $1,79 \mu\text{mol g}^{-1}$ no montante de MDA, aumentando os valores conforme aumentou a proporção do extrato, sendo que as plântulas submetidas ao tratamento na proporção de 10% a média foi de 5,97 nmol/g (Fig. 3).

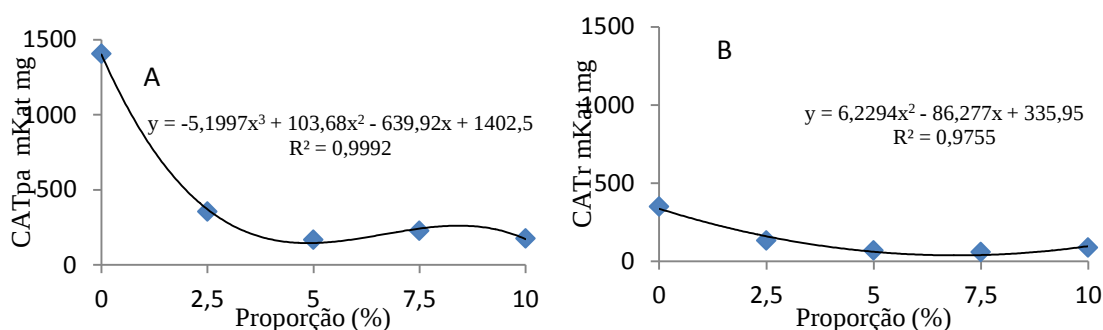


Figura 2. Gráfico da expressão da enzima catalase em parte aérea (CATpa) (A) e raiz (CATr) (B) de plântulas de milho, submetidas as diferentes proporções do extrato aquoso das folhas de *Inga marginata* W.

Figure 2. Graph of the expression of the enzyme catalase in aerial part (CATpa) (A) and root (CATr) (B) of corn seedlings, submitted to different proportions of the aqueous extract of the leaves of *Inga marginata* W.

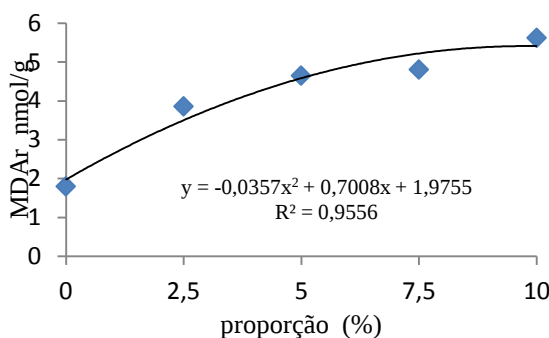


Figura 3. Gráfico de montante de malondialdeído da raiz (MDAr) de plântulas de milho submetidas as diferentes proporções do extrato aquoso das folhas de *Inga marginata* W.

Figure 3. Root malondialdehy uptake plot (MDAr) of maize seedlings submitted to different proportions of the aqueous extract of the leaves of *Inga marginata* W.

DISCUSSÃO

Segundo Silva (2012) a germinação de sementes é a menos sensível a ação dos aleloquímicos do que o desenvolvimento inicial de plântulas. Isso pode justificar o fato de, em nosso trabalho, o extrato aquoso das folhas de ingá não ter influenciado significativamente o processo germinativo (fig. 1), mas ter induzido a redução do comprimento da raiz primária das plântulas de milho (fig. 2).

Resultados semelhantes foram encontrados por Prates et al. (2000), que avaliaram o efeito do extrato aquoso de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, uma leguminosa arbórea como o ingá, sobre a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho. Os autores relatam que o extrato não influenciou a germinação das sementes de milho em nenhuma das proporções testadas, com extrato obtido com água fria e aquecida, no entanto relataram inibição da raiz seminal das plântulas de milho, dose dependente do extrato obtido com água aquecida.

Notamos que apesar de o extrato de ingá ter inibido o crescimento das raízes de milho, houve um incremento na massa seca da parte aérea das plântulas. Resultados semelhantes foram evidenciados por Spiassi et al., (2011) que constaram diminuição radicular e aumento da massa seca da parte aérea de plântulas de milho expostas ao extrato de cártamo. De acordo com Carvalho et al., (2016) o processo de crescimento da parte aérea é dependente das divisões celulares oriundas das estruturas ligadas à partição de nutrientes pela plântula. Possivelmente houve interferências na composição nutricional do substrato pela presença do extrato de ingá que pode ter gerado esse aumento observado.

O crescimento das raízes nas plantas ocorre por processo de multiplicação e alongamento de células meristemáticas, que pode ser interrompido por condições de estresses ambientais, como a exposição a substâncias tóxicas. A ação da auxina é um dos fatores que atuam no alongamento dessas

células, sendo que alterações nas proporções desse hormônio podem gerar distúrbios no crescimento de órgãos vegetais, por meio de alterações em processos relacionados ao gravitropismo e desenvolvimento vascular (TANIMOTO, 2005).

O transporte polar de auxina ocorre por intermédio de proteínas específicas e alguns compostos alelopáticos como os flavonoides, podem interromper esse transporte, por meio de inativações dessas proteínas (BROWN et al., 2001; TAYLOR; GROTEWOLD, 2005). Portanto essa pode ser uma das causas da relação encontrada, entre a redução do crescimento radicular das plântulas de milho e o aumento na proporção do extrato. Uma vez que foi identificado, a partir do screening fitoquímico, a presença de compostos pertencente à classe dos flavonoides e compostos fenólicos nas folhas de ingá (LUZ et al., dados não publicados).

Outro efeito observado pela ação dos aleloquímicos é a geração de ERO's, que levam a danos de membrana celular a partir da peroxidação de lipídios. Isto pode estar relacionado à inibição radicular observada no presente estudo, uma vez que segundo Barbosa et al. (2014) a peroxidação lipídica ocorre por uma cascata de reações que quando não controlada pode levar inclusive a morte celular. Destacamos também que segundo Lima e Abdalla (2001) e Gill e Tuteja (2010) esse dano pode ser quantificado pelo montante de MDA e identificamos uma relação de causa e efeito entre as proporções do extrato e os níveis de MDA na raiz das plântulas de milho, ocorrendo maior peroxidação lipídica na raiz das plântulas expostas as maiores proporções do extrato (fig. 4).

Dentre os mecanismos de proteção do organismo contra as EROs, estão as enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), que fazem a redução dessas espécies reativas de oxigênio a compostos mais estáveis, onde por exemplo o H_2O_2 é decomposto a O_2 e H_2O (GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012). Em nosso trabalho houve menor atividade da CAT, tanto na parte aérea como na raiz, das plântulas de milho expostas aos tratamentos com o extrato aquoso das folhas de ingá (fig. 3). O extrato inibiu a ação dessa enzima desde a proporção de 2,5%.

Segundo Choudhury et al (2013) estresses ambientais, como exposição a compostos alelopáticos, podem levar ao desequilíbrio no sistema antioxidante da planta e gerar danos que podem comprometer diversos fatores do desenvolvimento vegetal. Assim, sugerimos que o dano de membrana e redução radicular das plantas de milho observados em nosso trabalho pode estar relacionado à inibição da atividade da catalase. Esse desequilíbrio pode gerar um aumento nos níveis de EROs, como o H_2O_2 que apesar de não ser considerado um radical livre, sofre reações que dão origem ao $OH^\cdot$, altamente tóxico aos organismos, responsável pela peroxidação de lipídios das membranas celulares (BARBOSA et al., 2014).

Outro fator que pode ter interferido na inibição do crescimento radicular das plântulas de milho, observados no presente estudo (fig. 2B), pode ser a lignificação de parede celular. De acordo com Bentes e Matsuoka (2005) o H_2O_2 é um agente promotor para a formação da lignina, responsável por aumentar a rigidez da parede celular, por exemplo na proteção contra patógenos. Em eventos de estresse, como o observado em nosso trabalho, os níveis elevados de H_2O_2 podem promover a rápida deposição da lignina, ocasionando inclusive a morte celular (SOARES et al., 2012; HABERMANN et al., 2016). Suzuki et al. (2008) sugeriram em seu trabalho redução radicular de cultivares de soja, em consequência da maior lignificação da parede celular e que um dos precursores desses efeitos é o ácido ferúlico, pertencente ao grupo dos compostos fenólicos.

Nossos resultados para o crescimento inicial de plântulas foram semelhantes aos encontrados por Ribeiro et al. (2017), onde notaram diminuição significativa do comprimento médio da raiz de plântulas de pepino, induzidas pelo extrato aquoso de uma leguminosa arbórea (*Leucaena leucocephala*). Os autores notaram que, em 168 horas de germinação, houve maior atividade da catalase para a testemunha, comparada aos outros tratamentos, podendo supor que essa redução também seja decorrente do estresse oxidativo.

Assim, sugerimos que inibição do crescimento radicular das plântulas de milho observadas nesse estudo foi devido à indução ao estresse oxidativo causada pelos compostos alelopáticos presentes no extrato aquoso de ingá, pois, nota-se que as plântulas que tiveram maiores inibições do crescimento radicular, também apresentaram menor expressão da enzima antioxidante CAT, sendo que os danos de membrana possivelmente causados pela ação das EROs puderam ser quantificados pelos níveis de peroxidação lipídica.

No entanto, destacamos que segundo Ferreira e Aquila (2000) e Ferreira e Borguetti (2004) os efeitos alelopáticos podem variar de acordo com o ambiente em que as espécies estão inseridas. Os resultados obtidos em experimentos laboratoriais podem ser diferentes dos efeitos observados em casa de vegetação ou a campo, contudo possuem suma importância para a tomada de decisões.

Diante dos resultados obtidos, não aconselhamos o consórcio entre as espécies antes da realização de bioensaios que investiguem o efeito alelopático em condições mais próximas ao campo.

CONCLUSÕES

- O extrato aquoso das folhas secas de ingá não interfere na germinação das sementes de milho.
- O extrato aquoso das folhas secas de ingá induz ao estresse oxidativo de plântulas de milho inibindo a atividade da enzima antioxidante catalase e aumentando a peroxidação lipídica, além de inibir o crescimento radicular das plântulas de milho.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G. D. DE; ZUCOLOTO, M.; ZETUN, M.C; COELHO, I; SOBREIR, F. M. Estresse Oxidativo Em Células Vegetais Mediante Aleloquímicos. **Rev.Fac.Nal.Agr.Medellin**, v. 61, n. 1, p. 4237–4247, 2008.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciencia Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.

BENTES, J. L. S.; MATSUOKA, K. Localização de peróxido de hidrogênio durante a resposta de defesa de tomateiro contra *Stemphylium solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 643–646, 2005.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. **Annals of Botany**, v. 91, p. 179–194, 2003.

BROWN, D. E. et al. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in arabidopsis. **Plant physiology**, v. 126, p. 524–535, 2001.

CARVALHO, W. P.; TEIXEIRA, L. G. V.; ABBADE NETO, D. O.; MOREIRA, J. M. S.; CUNHA, C. E. Alelopatia de resíduos de plantas de cobertura no controle de braquiária cv. Marandu. **R. bras. Bioci.**, V14, n 2, p. 60-69, 2016.

CHOUDHURY, S. et al. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 4, p. e23681, 2013.

CORSATO, J. M. et al. Estresse oxidativo mediado por aleloquímicos e sua implicações na germinação e crescimento inicial de plantas. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 5, n. 5, p. 136–150, 2016.

EWERT, M. et al. Sistemas agroflorestais multiestrata e a legislação ambiental brasileira: desafios e soluções. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 36, p. 95–114, 2016.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. (2000). Alelopatia: uma area emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira De Fisiologia Vegetal*, 12(Especial), 175–204.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323p.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909–930, 2010.

GNIAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, n. 3, p. 395–407, 2005.

HABERMANN, E. et al. Phytotoxic potential of young leaves from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae). **Braz. J. Biol. Braz. J. Biol**, v. 76, n. 2, p. 531–538, 2016.

LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2001.

MATTAR, E. P. L. et al. **Sistema de Cultivo em Aleias - Manual Técnico**. p. 48. Cruzeiro do Sul, AC, 2013

MOURÃO JÚNIOR, M.; SOUZA FILHO, A. P. S. Diferenças no Padrão da Atividade Alelopática em Espécies da Família Leguminosae. **Planta Daninha**, v. 28, p. 939–951, 2010.

ORACZ, K. et al. Induction of oxidative stress by sunflower phytotoxins in germinating mustard seeds. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, p. 251–264, 2007.

- POSSETTE, R. F. DA S.; RODRIGUES, W. A. O gênero *Inga* Mill. (Leguminosae - Mimosoideae) no estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 354–368, jun. 2010.
- PRATES, H. T. et al. Efeito do extrato aquoso de leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 909–914, maio 2000.
- RIBEIRO, V. D. M. et al. Antioxidative enzymes of *Cucumis sativus* seeds are modulated by *Leucaena leucocephala* extracts. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 39, n. 3, p. 373, 18 set. 2017.
- SHARMA, P. et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, p. 1–26, 2012.
- SILVA, C. B. et al. Atividade alelopática dos lixiviados de *Asemeia extraaxillaris* (Polygalaceae) sobre o crescimento de *Ipomoea cordifolia*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, p. 215–222, 2016.
- SILVA, P. S. S. DA. Atuação dos aleloquímicos no organismo vegetal e formas de utilização da alelopatia na agronomia. **Biotemas**, v. 25, n. 3, p. 65–74, 2012.
- SOARES, A. R. et al. The effects of l-DOPA on root growth, lignification and enzyme activity in soybean seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, p. 1811–1817, 2012.
- SPIASSI, A.; FORTES, A. M. T.; PEREIRA, D. C.; SENEM, J.; TOMAZONI, D. Alelopatia de palhadas de coberturas de inverno sobre o crescimento inicial de milho. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 32, n. 2, p. 577–582, 2011.
- TANIMOTO, E. Regulation of Root Growth by Plant Hormones — Roles for Auxin and Gibberellin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n. 4, p. 249–265, 2005.
- TAYLOR, L. P.; GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 3, p. 317–323, jun. 2005.

Anexo 1

Normas para publicação

O artigo deverá estar em formato compatível com Microsoft-Word, com as seguintes características:

Formato da página A4; espaçamento de texto: simples; margens: superior 3,0 cm, inferior 3,0 cm, esquerda 2,5 cm e direita de 2,5 cm; tamanho 10, fonte times new roman, alinhamento justificado, recuo especial na primeira linha de 1,25 cm em cada parágrafo, espaçamento simples, número de páginas: máximo de 10, incluindo tabelas e figuras.

Todos os itens (introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões e referências) devem estar em negrito à esquerda, não numerados e em caixa alta. Quando houver subitens, deverá ser obedecida a seguinte ordem: o primeiro subitem deverá ser em negrito, em caixa baixa, somente a primeira inicial maiúscula; o segundo subitem igual ao primeiro sem negrito. Não é permitido o uso de anexos.

TÍTULO: centralizado, sem negrito, em caixa alta, em fonte tamanho 14, não ultrapassando 20 palavras.

AUTOR(ES): essas informações não devem constar na versão da submissão, só serão inseridas no momento para publicação, mas devem ser cadastradas no Sistema Eletrônico de Revistas (SER) no ato da submissão.

em fonte tamanho 10, logo abaixo do título, centralizado(s), somente a primeira inicial maiúscula, chamamento com sobrescrito. Abaixo do(s) nome(s) do(s) autor(es), separado(s) por apenas um espaço, em tamanho 8, devem constar: instituição a que pertence(m), cidade, estado, país e endereço eletrônico. O autor para correspondência deve ser destacado.

É necessário que seja encaminhada a descrição detalhada de contribuição de cada um dos autores do artigo, e o número máximo não deve exceder a 6. A declaração deve ser anexada no sistema como DOCUMENTO SUPLEMENTAR.

RESUMO E ABSTRACT: as palavras resumo e abstract somente com as iniciais maiúsculas, centralizadas e em negrito, e os seus textos redigidos num único parágrafo, não excedendo 250 palavras, fonte 9, times new roman, recuo do texto em 1 cm esquerdo e direito. No final do resumo e do abstract devem ser incluídas até cinco palavras-chave/keywords, diferentes das contidas no título do artigo. No início do abstract deve constar o título do artigo em inglês e em itálico.

INTRODUÇÃO: deve obrigatoriamente apresentar a(s) hipótese(s) e o(s) objetivo(s) do trabalho. Nomes científicos, quando citados pela primeira vez no texto, devem ser escritos na íntegra: gênero, espécie e autor(es). Siglas e abreviaturas, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, devem ser colocadas

entre parênteses, precedidas do nome por extenso. As citações devem seguir o sistema de nome e ano (ver REFERÊNCIAS).

MATERIAL E MÉTODOS: artigos que envolvam plantas e outras formas de vida (fungos, insetos etc.) devem apresentar o número de registro de tombamento em instituições que mantêm coleções científicas de acesso público. A omissão acarretará a recusa do manuscrito.

As fórmulas e equações devem ser inseridas com a função Equation do Word.

RESULTADOS: tabelas e figuras deverão ser incluídas ao longo do texto, com títulos em caixa baixa, exceto a letra inicial, em português e em inglês. As tabelas devem ser produzidas em editor de texto (Word) e não podem ser inseridas no texto como figuras. As figuras, compostas por gráficos, fotografias e mapas, sem sombreamento e sem contorno. As dimensões (largura e altura) não devem ser maiores que 15 cm, sempre com orientação da página na forma retrato, com legendas na fonte Times New Roman, não-negrito e não-italico. Mapas devem ter escala gráfica. A soma do número de figuras e de tabelas não deve ultrapassar oito.

DISCUSSÃO: a discussão deve ser apresentada em item separado dos resultados. As citações devem seguir o sistema de nome e ano (ver REFERÊNCIAS).

CONCLUSÕES: devem ser organizadas em forma de itens e não se admite citações bibliográficas.

AGRADECIMENTOS: se houver.

REFERÊNCIAS: pelo menos 70% das referências devem ser de artigos científicos dos últimos 10 anos. O número de citações não deve ultrapassar a 25. Não serão admitidas citações de teses, dissertações e trabalhos publicados em eventos científicos.

As citações que estiverem em texto corrente devem estar em caixa baixa e as entre parênteses, em caixa alta. Quando houver três ou mais autores, a citação será feita utilizando-se “et al.”(em itálico). Todos os autores deverão ser citados nas referências. Ex.: Martins (2009); Campos e Leite (2009); Wendling et al. (2014); (LARCHER, 2006); (BARBOSA; FARIA, 2006); (VENDRAMINI et al., 2011). Quando houver mais de uma referência do mesmo autor em um mesmo ano, essas deverão ser distinguidas por letra minúscula após a data. Ex.: Machado (2011a); Machado (2011b).

As referências bibliográficas devem estar em ordem alfabética, seguindo as normas da ABNT- NBR - 6023, assim como outros aspectos não contemplados nesta normativa, conforme exemplos abaixo:

a) Livro:

TEIXEIRA, W.; TOLEDO, M. C. M. de; FAIRCHILD, T. R.; TAIOLI, F. Decifrando a Terra. São Paulo: Oficina de Textos, 2 ed. 2009, 624 p.

b) Capítulo de livro:

MARTINS, F. R.; BATALHA, M. A. Formas de vida, espectro biológico de Raunkiaer e fisionomia da vegetação. In: FELFILI, J. M.; ENSENLOHR, P. V.; MELO, M. M, da R. F. de; ANDRADE, L. A. de; MEIRA NETO, J. A. A. Fitossociologia no Brasil: métodos e estudos de caso. Viçosa: Ed. UFV, 2011, 556 p.

c) Artigo de periódico:

PEREIRA, L. A.; PINTO SOBRINHO, F. de A.; COSTA NETO, S. V. Florística e estrutura de uma mata de terra firme na reserva de desenvolvimento sustentável rio Iratapuru, Amapá, Amazônia Oriental, Brasil. Floresta, Curitiba, v. 41, n. 1, p. 113 - 122, 2011.

COPENHAVER, P. E.; TINKER, D. B. Stand density and age affect tree-level structural and functional characteristics of young, postfire lodgepole pine in Yellowstone National Park, Forest Ecology and Management, Amsterdam, v. 320, p. 138 - 148, 2014.

d) Internet:

MISSOURI BOTANICAL GARDEN - MOBOT. Explore the beta release of web TROPICOS. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/>> Acesso em: 01/12/2014.

e) Legislação:

BRASIL. Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa; altera as Leis nos 6.938, de 31 de agosto de 1981, 9.393, de 19 de dezembro de 1996, e 11.428, de 22 de dezembro de 2006; revoga as Leis nos 4.771, de 15 de setembro de 1965, e 7.754, de 14 de abril de 1989, e a Medida Provisória no 2.166-67, de 24 de agosto de 2001; e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, vinte cinco de maio de 2012. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2012/Lei/L12651.htm>. Acesso em: 01 dez 2014.

CAPITULO 2

ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM
PLÂNTULAS DE MILHO SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM *Inga*
marginata W. EM CASA DE VEGETAÇÃO.

O artigo segue as normas de formatação da
revista Anais da Academia Brasileira de
Ciências. Anexo II do capítulo 1.

ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM
PLÂNTULAS DE MILHO SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM *Inga*
marginata W. EM CASA DE VEGETAÇÃO.

Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz^{*1}, Erly Carlos Porto¹, Guilherme Garcia Rodrigues¹, Maiara
Iadwizak Ribeiro¹, Ana Paula Bazzanella², Gabriele Mathias², Jaqueline Malagutti Corsato¹,
Andréa Maria Teixeira Fortes¹.

1. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais. Cascavel, Paraná, Brasil.

2. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Laboratório de Fisiologia Vegetal. Cascavel, PR, Brasil.

Palavras chave: alelopatia; crescimento inicial; emergência; estresse oxidativo;
enzimas antioxidantes; sistemas agroflorestais.

Sessão: Ciências Ambientais

*autor para correspondência: Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz email:

emzluz@gmail.com

Resumo

O objetivo do trabalho foi investigar o efeito alelopático do ingá sobre a emergência, crescimento inicial e resposta antioxidante de plântulas de milho. Para o teste de emergência em casa de vegetação os tratamentos foram constituídos pelas diferentes proporções do extrato aquoso de ingá, sendo avaliada a porcentagem de emergência, tempo médio de emergência, índice de velocidade de emergência, sincronização e frequência relativa. Para o teste de crescimento inicial foram obtidos a testemunha (T1) e o tratamento dois (T2) que recebeu cobertura do solo com pó das folhas secas de ingá, avaliando a massa seca de parte aérea, massa seca de raiz, comprimento médio de parte aérea e comprimento médio de raiz. Para avaliar o estresse oxidativo sobre crescimento inicial foi quantificada a atividade das enzimas, superóxido dismutase, peroxidase e catalase, além da peroxidação lipídica pelos níveis de malondialdeído. Não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos para as variáveis avaliadas na emergência e crescimento inicial das plântulas de milho. No entanto, registramos que houve maior expressão da catalase, tanto em raiz como em parte aérea e menor peroxidação lipídica na parte aérea das plântulas submetidas ao tratamento dois. Assim sendo, concluímos que o consórcio entre as espécies é viável.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda na recuperação de áreas degradadas impulsiona a criação de práticas produtivas, que garantam o desenvolvimento econômico sustentável. No meio rural uma das práticas que vem sendo estudada nos últimos anos é o consórcio entre espécies vegetais em sistemas de cultivo agroflorestais (SAFs). Esse tipo de sistema visa minimizar danos como erosão e baixa fertilidade do solo, além da perda da biodiversidade causada pelos sistemas convencionais de cultivo (Ewert et al., 2016).

Nos SAFs do tipo em aleias, os componentes arbóreos são podados periodicamente e as folhas depositadas ao solo para fins de cobertura e adubação verde (Abdo et al., 2008; Meirelles & Souza, 2015). Porém, a escolha de espécies adequadas para serem utilizadas é um ponto chave para o desenvolvimento desses sistemas, pois, existem alguns fatores que podem trazer prejuízos para a produção; como o efeito alelopático que quando negativo pode afetar o desenvolvimento das espécies cultivadas (Souza Filho et al., 2010).

Os efeitos alelopáticos são diversos, podendo afetar tanto a germinação de sementes como o crescimento inicial de plântulas. Dentre os efeitos causados pelos aleloquímicos está a indução ao estresse oxidativo, que ocorre pelo desequilíbrio no sistema antioxidante do organismo vegetal, podendo causar danos estruturais ou até a morte da planta (Corsato et al., 2016).

Naturalmente nos organismos aeróbios, ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), que são formados em compartimentos das células de intenso fluxo de elétrons, como na mitocôndria, cloroplastos e

peroxissomos (Choudhury et al., 2013). Os radicais livres podem causar diversos danos nas estruturas das células, como degradação de proteínas e DNA, além de danos de membranas pela peroxidação lipídica.(Barbosa et al., 2010; Choudhury et al., 2013).

No entanto os organismos possuem mecanismos de defesa contra a ação dessas EROS, que consiste em um sistema antioxidante enzimático e não enzimático, que controla os níveis intracelular desses compostos. As principais enzimas envolvidas nesses processos são; a superóxido dismutase (SOD) que faz a conversão do radical O_2^- a H_2O_2 , a catalase (CAT) e a peroxidase (POD) que decompõem o H_2O_2 a O_2 e água, evitando assim, que ocorra o estresse oxidativo (Sharma et al., 2012).

Dentre as arbóreas indicadas para adubação verde em sistemas de aleia está o *Inga marginata* W., que possui rápido crescimento e aceita bem as podas, realizadas para a deposição da matéria orgânica (Silva et al., 2007; Mattar et al., 2013; Paes et al., 2015).

Estudos investigando os efeitos alelopáticos do *Inga marginata* sobre uma espécie bioindicadora, em condições de laboratório, foram realizados por Luz et al., (dados não publicados), sendo observado danos na germinação das sementes. Já para o milho, Luz et al. (dados não publicados) verificaram que os extratos das folhas de ingá não influenciaram na germinação, porém houve indução do estresse oxidativo nas plântulas de milho, inibindo a atividade da enzima catalase, o que aumentou a peroxidação lipídica e inibiu o crescimento das raízes.

Apesar de haverem abordagens laboratoriais estudando o efeito alelopático do ingá, vale destacar que os efeitos podem variar de acordo com as condições ambientais em que as espécies estão expostas. Os resultados obtidos a partir de bioensaios laboratoriais podem ser diferentes daqueles adquiridos em casa de vegetação ou a campo (Ferreira & Aquila, 2000; Ferreira & Borguetti, 2004).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar em casa de vegetação, o efeito alelopático do ingá sobre a emergência, crescimento inicial e atividade antioxidante de plântulas de milho e assim obter uma resposta sobre a possibilidade do consórcio entre as espécies em sistemas agroflorestais de cultivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos na Casa de Vegetação e no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, campus de Cascavel-PR. No período de agosto de 2016 a agosto de 2017.

As folhas de *Inga marginata* Willd. foram coletadas no município de Serranópolis do Iguaçu-PR, em um fragmento de mata, sob as coordenadas 25°38'94.81"S 53°99'58.26"W. Uma excicata foi registrada no Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Cascavel, sob registro 4138. Depois da coleta as folhas de ingá foram submetidas ao processo de secagem, permanecendo em estufa de circulação de ar forçada à 40° C até que o peso se mantivesse constante. Após a secagem o material obtido foi

triturado em moinho de facas do tipo Willye modelo star ft 50 e o pó acondicionado em temperatura ambiente e protegido da luz.

As sementes de milho (*Zea mays* L) variedade IPR 164 Lote: 3210090, utilizadas para os bioensaios de emergência e crescimento inicial nesse trabalho, foram obtidas em comércio local no ano de 2016.

2.1. Emergência em casa de vegetação

Para o teste de emergência, foram utilizados cinco tratamentos, compostos pelas proporções do extrato aquoso do pó das folhas secas de ingá, sendo, água destilada 0% (testemunha); 2,5%; 5,0%; 7,5% e 10% p/v. Após a obtenção dos extratos esses permaneceram em repouso por um período de quatro horas e depois foram filtrados em filtro de pano.

O pH e o potencial osmótico dos extratos foram avaliados, antes da realização dos bioensaios e considerados adequados para a germinação das sementes de milho (Souza filho & Dutra, 1998; Prates et al., 2000; Silva Jr et al., 2014). O pH dos extratos e da água destilada foram avaliados com pHmetro MICRONAL B474, variando de 6,0 a 8,0, já o potencial osmótico foi medido pelo índice de refração utilizando-se de refratômetro analógico (°BRIX), todos os tratamentos apresentaram valores acima de -0,0079 MPa.

Para cada tratamento foram realizadas quatro repetições de 50 sementes de milho, colocadas para germinar em bandejas de plástico com substrato vermiculita, cada repetição em uma bandeja. Foram dispostos 220 gramas de vermiculita em cada bandeja, umedecidas com 3 vezes o peso seco do substrato com o extrato referente a cada tratamento, aproximadamente 660 ml.

Após a umidificação, foi utilizado um marcador de sementes para as perfurações do substrato, onde foram dispostas as sementes de milho na profundidade de aproximadamente 2,5 cm. Depois do plantio as bandejas foram acondicionadas em casa de vegetação, com controle de ventilação e umidade onde permaneceram por um período de oito dias.

A contagem das plântulas emergidas foi realizada diariamente até o 8º dia, sempre no mesmo horário, considerando como emersas as plântulas visíveis, que apresentassem mais de 0,5 cm de parte aérea acima da superfície do substrato (Correia & Durigan, 2004). As variáveis analisadas foram porcentagem de emergência (PE), tempo médio de emergência (TME) segundo Edmond e Drapala (1958), índice de velocidade de emergência (IVE) segundo Silva e Nakagawa (1995) e frequência e sincronização de emergência segundo Labouriau e Valadares (1976).

2.2. Crescimento inicial em casa de vegetação

Para o bioensaio de crescimento inicial, utilizou-se vasos plásticos do tamanho 2 com capacidade de 250 mL. Os vasos foram preenchidos com substrato vermiculita umedecido com três vezes o peso seco do substrato, sendo plantadas de 3 a 4 sementes de milho em cada vaso na profundidade de 2,5 cm, postos para germinar em casa de vegetação, com controle de ventilação e umidade. Após a emergência foi realizado o desbaste deixando apenas uma plântula por vaso. Nesse momento, foram separados aleatoriamente os vasos para compor os tratamentos.

Foram considerados dois tratamentos: testemunha (T1), na qual as plântulas foram cultivadas apenas em substrato vermiculita e regadas com

água e o tratamento dois (T2) onde foi colocado o pó das folhas de ingá sobre a superfície do substrato, regando com água. Cada tratamento foi constituído de oito repetições com dez plântulas, totalizando 160 vasos.

O cálculo da quantidade do pó adicionado na superfície do substrato foi feito seguindo a metodologia proposta por Rizzardi et al. (2008) na qual foi calculada a média da deposição de serapilheira nas formações vegetais de Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Semidecidual, características da região Oeste do estado do Paraná, que foi de 7241 kg ha^{-1} . O valor foi calculado para que a quantidade de pó adicionado fosse proporcional à deposição de serapilheira ocorrida em ambiente natural. Os vasos utilizados nesse experimento possuíam 14 centímetros de diâmetro e área aproximada de 154 cm^2 , sendo necessários 11,15 gramas de pó.

As plântulas foram regadas diariamente, considerando a evaporação como parâmetro da quantidade de água ser adicionada. Foi utilizado um Cap Tampão de PVC graduado em centímetros para o cálculo da quantidade de água evaporada. Depois de calcular a porcentagem de água evaporada do recipiente, realizavam-se as regas repondo a quantidade necessária.

Após o período de 10 dias o experimento foi desmontado e as plantas avaliadas quanto o comprimento médio e a massa seca de parte aérea e raiz, além das análises das enzimas Catalase (CAT), Peroxidase (POD), Superóxido dismutase (SOD) e peroxidação lipídica.

2.3. Análise enzimática

A extração das proteínas solúveis foi de acordo com metodologia proposta por Kar e Misha (1976), sendo o ponto de partida para determinação

e quantificação das enzimas antioxidantes SOD, POD, CAT e montante de MDA. Foi utilizado 100 mg de material (raízes e parte aérea separadamente) triturado em nitrogênio líquido, homogeneizados com o auxílio de almofariz em 2 mL de tampão extração fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹ pH 6,8. O macerado foi centrifugado a 12000 rpm por 20 minutos. A determinação das proteínas solúveis totais foi realizada pelo método de Bradford (1976).

A quantificação da atividade da CAT seguiu metodologia proposta de Azevedo et al., (1998) sendo expressa em nmol de H₂O₂ consumido min⁻¹ mg⁻¹. A quantificação da POD foi de acordo com citado por Teisseire; Guy (2000) e Corsato (2014), em μ mol de purpuroloína min⁻¹. Para a enzima SOD a seguiu-se a metodologia proposta por Beauchamp; Fridovich (1971), expressa em U/mg de proteína. E a peroxidação lipídica pelo montante de MDA conforme proposto por Heath; Packer (1968) citado por Corsato 2014 e expresso em nmol g⁻¹ da massa fresca.

2.4. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental adotado para os bioensaios de emergência e crescimento inicial foi em blocos casualizados. Para os testes de emergência foram obtidos cinco tratamentos com quatro repetições, onde cada repetição foi disposta em um bloco, tendo, portanto, quatro blocos. O bioensaio de crescimento inicial foi formado por dois tratamentos com oito repetições cada tratamento, cada repetição pertencendo a um bloco, portanto, oito blocos.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% e quando houve diferença significativa entre os tratamentos foi realizado teste de Tukey, por meio do programa RStudio 3.2..

Os dados da atividade da enzima CAT em parte aérea foram transformados por raiz quadrada mais um, para que atendessem os requisitos de normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk.

3. RESULTADOS

3.1. Emergência em casa de vegetação

O extrato aquoso de ingá não interferiu sobre as variáveis porcentagem , tempo médio, índice de velocidade e sincronização da emergência das plântulas de milho ($p>0,05$) (fig.1). Também não houve diferenças estatísticas entre os blocos, demonstrando que os resultados não foram influenciados pelas condições ambientais.

Notamos, porém, a partir do gráfico de frequência relativa (fig. 1), que há diferenças na distribuição temporal de emergência das plântulas de milho entre os tratamentos. As plântulas testemunhas apresentaram um pico de emergência bem definido, no quarto dia, contados a partir da montagem do experimento, onde 53% das plântulas emergiram. Já para os demais tratamentos a porcentagem de plântulas emergidas nesse mesmo período foi menor, sendo 42%, 47% e 48% para o T2, T3 e T4 respectivamente, com pico de emergência não bem definido. O tratamento constituído de 10% do extrato apresentou 36% de emergência no quarto dia, tendo o pico no quinto dia com 49%.

Assim, apesar de não serem registradas diferenças estatísticas entre as variáveis de emergência das plântulas de milho, o extrato influenciou na distribuição do processo, ao atrasar a emergência das plântulas.

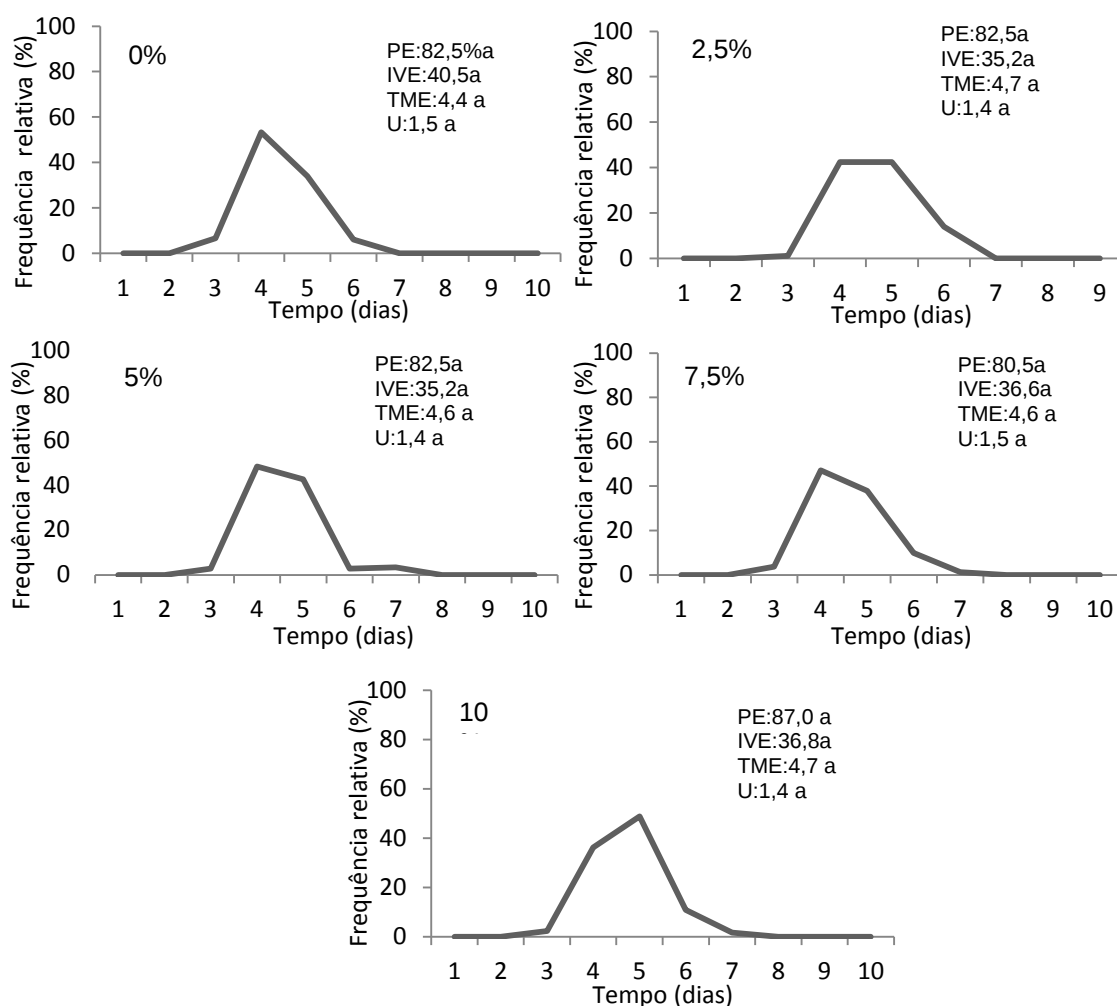


Figura 1. Gráfico de frequência relativa de emergência de sementes de milho submetidas as diferentes proporções do extrato aquoso do pó das folhas secas de *Inga marginata* W.. PE=Porcentagem de emergência IVE=Índice de velocidade de emergência TME=Tempo médio de emergência U=Índice de uniformidade ou sincronização da emergência.

3.2. Crescimento inicial

A análise estatística mostra que não houve diferenças entre os tratamentos para as variáveis, massa seca da raiz e parte aérea e comprimento médio da raiz e parte aérea ($p>0,05$). A massa seca das raízes das plântulas de milho foi de 1,23g para a testemunha 1,42g para as plântulas submetidas ao

tratamento com o pó das folhas de ingá. As plântulas testemunhas apresentaram média de massa seca da parte aérea igual a 0,88 g, enquanto que as submetidas ao tratamento com cobertura de solo apresentaram média igual a 0,82 g.

O comprimento médio da raiz das plântulas de milho pertencentes ao grupo das testemunhas foi de 31,43 cm, enquanto que aquelas expostas ao pó das folhas de ingá apresentaram 32,11cm. O comprimento médio da parte aérea das plântulas de milho na testemunha foi de 9,21 cm. Já aquelas expostas ao tratamento dois apresentaram 10,15 cm.

De acordo com análise estatística, não há diferenças entre os blocos para nenhuma das variáveis de crescimento inicial ($p>0,05$). O que significa que as condições ambientais não interferiram na análise dos efeitos observados.

3.3. Análise enzimática

Na tabela 1 estão dispostas as médias da atividade enzimática e níveis de peroxidação lipídica das plântulas de milho. A análise de variância dos dados mostra que não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos para a atividade das enzimas superóxido dismutase e peroxidase tanto na parte aérea como na raiz das plântulas de milho. Também não houve diferenças entre os tratamentos para peroxidase na raiz.

Tabela 1. Atividade enzimática e peroxidação lipídica em plântulas de milho submetidas a diferentes tratamentos de cobertura de solo com o pó das folhas secas de *Inga marginata* W.. POD=atividade da peroxidase em μmol purpurogalina $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. CAT= atividade da catalase em nmol de

$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína. SOD= atividade da superóxido dismutase em U/mg de proteína. MDA=montande de malondialdeido em nmol g^{-1} . pa=parte aérea. r=raiz

Table 1. Enzymatic activity and lipid peroxidation in maize seedlings submitted to different soil cover treatments with the dry leaves powder of *Inga marginata* W .. POD = peroxidase activity in μmol purpurogalin $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein. CAT = catalase activity in $\text{nmol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein. SOD = superoxide dismutase activity in U / mg protein. MDA = montane of malondialdehyde in nmol g^{-1} . pa = aerial part. r = root

Parâmetros	Tratamentos		C.V.%
	Testemunha	Cobertura	
SODpa	255,72a	165,30a	71,81
CATpa	0b	735a	49,48
PODpa	12,52 ^a	10,15a	64,01
MDApa	9,52 ^a	5,74b	29,95
SODr	202,91a	181,88a	54,65
CATr	185,69b	355,88a	44,31
PODr	55,32 ^a	105,83a	54,31
MDAr	4,21 ^a	3,05a	41,95

*letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

Não foi detectável a atividade da enzima catalase na parte aérea das plântulas de milho testemunhas, sendo, portanto, estatisticamente diferente do tratamento que recebeu cobertura da superfície do substrato com o pó das folhas de ingá ($p < 0,05$). Esse apresentou atividade média de $735 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína da enzima catalase.

Também houve diferença estatística entre os tratamentos para a peroxidação lipídica na parte aérea das plântulas de milho ($p < 0,05$). As plântulas expostas ao tratamento com o pó das folhas secas de ingá

apresentaram menores índices de MDA, 5,74 nmol g⁻¹ de massa fresca, enquanto a testemunha apresentou 9,52 nmol g⁻¹ de massa fresca (tabela 1).

A expressão enzimática da catalase na raiz diferiu entre os tratamentos empregados. As plântulas expostas ao tratamento com o pó das folhas de ingá apresentaram maior atividade dessa enzima, 355,88 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, enquanto as plântulas testemunhas apresentaram 185,69 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (tabela 1).

4. DISCUSSÃO

O controle do pH e potencial osmótico, do extrato vegetal utilizado em experimentos como o nosso é essencial, pois açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e outras substâncias, podem estar presentes e influenciar estas variáveis (Ferreira & Aquila, 2000). Em nosso trabalho, tanto o pH quanto o potencial osmótico do extrato das folhas de ingá, utilizados em nosso trabalho para o bioensaio de emergência, podem ser considerados adequados para a germinação das sementes.

No bioensaio de emergência notamos que, apesar de não haver diferenças estatísticas entre os tratamentos, houve, quando analisado pelo gráfico de frequência relativa, atraso na emergência das plântulas de milho submetidas ao tratamento com o extrato das folhas de ingá, tendo o pico de emergência deslocado para o quinto dia (fig.1). Isso pode ser devido à ação dos aleloquímicos presente no extrato. Uma vez que segundo García-Sánchez et al. (2012) alguns compostos, como os fenólicos, podem influenciar a germinação de sementes, restringindo a mobilização de reservas para o embrião.

De acordo com García-Sánchez et al. (2012) esses compostos restringem a mobilização de reservas pela inativação de algumas enzimas específicas ou hormônios, como a alfa-amilase e ácido giberélico. Isso pode justificar o atraso na emergência observado em nossos resultados de frequência relativa, visto que, Luz et al. (dados não publicados) identificaram a partir de triagem fitoquímica, a presença de compostos fenólicos, como flavonoides e taninos no extrato das folhas de ingá.

Porém, os efeitos causados pela ação dos aleloquímicos são bastante diversos. Esses compostos podem interferir em muitos outros processos de desenvolvimento vegetal, como por exemplo, causando desequilíbrio no sistema antioxidante da planta. O desequilíbrio leva ao aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), que dependendo do grau de intoxicação podem gerar danos às estruturas celulares e até a morte do organismo (Silva, 2012).

Dentre as EROs, a mais tóxica ao organismo é o $\text{OH}^\cdot$, originado a partir de reações do H_2O_2 . Por meio da retirada de um H dos ácidos graxos, leva a peroxidação de lipídios, causando reação em cadeia que podem levar a morte celular (Barbosa et al., 2014). Uma das enzimas responsável pelo controle desse radical é a CAT, que decompõe o H_2O_2 em O_2 e água (Choudhury et al., 2013).

Na tabela 1 podemos observar que a cobertura do solo com o pó das folhas de ingá induziu a um aumento nos níveis de atividade da enzima CAT, tanto na parte aérea como nas raízes das plântulas de milho. O aumento observado pode ter ocorrido em resposta a uma elevação nos níveis de EROs,

causado pelo estresse gerado na presença dos aleloquímicos (Mahdavia et al., 2017).

O aumento da atividade da CAT observado nos resultados pode ocorrer em resposta a estresses ambientais, como o proporcionado pelas substâncias alelopáticas. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos. Mahdavia et al., (2017) notaram aumento da atividade da catalase em plântulas de *Raphanus sativus* L., submetidas ao extrato aquoso de hortelã-pimenta. Ventura et al., (2016) registraram que o óleo volátil de *Cleome guianensis* Aubl, induz o aumento da atividade dessa enzima em plântulas de *Senna occidentalis* L.

Como a CAT é responsável pela eliminação de H_2O_2 , os compostos alelopáticos presentes no pó das folhas de ingá podem ter levado à um estresse que desencadeou a produção dessa ERO, pois, de acordo com Barbosa et al. (2010) e Choudhury et al. (2013) os aleloquímicos podem, por meio de interrupções no fluxo normal de elétrons, fazer com que a redução do O_2 ocorra de forma incompleta, gerando assim as espécies reativas, como o O_2^- , H_2O_2 e OH^- .

É importante destacar que não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos na atividade específica das outras enzimas estudadas (Tabela 1): a superóxido dismutase (SOD) que faz a conversão do radical O_2^- a H_2O_2 e a peroxidase (POD) que, como a CAT, decompõe o H_2O_2 a O_2 e água (Sharma et al., 2012). Sugerimos que, apesar de os compostos presentes no pó das folhas de ingá terem causado estresse às plântulas de milho, a CAT foi eficaz

no controle dos radicais livres, não permitindo que ocorressem danos estruturais.

Os possíveis danos causados pela ação das EROs, mais especificamente do radical $\text{OH}^\cdot$, podem ser quantificados pelos níveis de peroxidação lipídica, medido pelo montante de MDA (Lima & Abdalla, 2001). No entanto, verificamos que não houve diferença estatística entre os tratamentos para essa variável na raiz das plântulas de milho e que, a peroxidação lipídica foi menor na parte aérea das plântulas expostas ao pó das folhas de ingá do que nas da testemunha (Tabela 1).

Podemos notar que o sistema antioxidante das plântulas de milho se mostrou eficiente na remoção das EROs, o que pode ser confirmado pela análise da peroxidação lipídica, mostrando que não houve danos de membranas. Destacamos também, que não houve interferência alelopáticas nas variáveis de crescimento inicial.

A partir dos resultados obtidos com esse trabalho, concluímos que o consórcio entre as espécies estudadas pode ser viável. Pois, apesar do extrato das folhas de ingá ter influenciado na distribuição da emergência e terem ocorrido alterações na atividade enzimática, não foi suficiente para causar prejuízos no desenvolvimento das plântulas de milho em casa de vegetação.

5. REFERÊNCIAS

Abdo, M. T. V. N.; Valeri, S. V.; Mello, M. A. L. (2008). Sistemas Agroflorestais e Agricultura Familiar: Uma parceria interessante. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**, 1, 50–59.

Barbosa, K. B. F.; Costa, N. M. B.; Alfenas, R. C. G.; De Paula, S. O.; Minim, V. P. R.; Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, 23(4), 629–643.

Barbosa, M. R.; Silva, M. M. A.; Villadino, L.; Ulisses, C.; Camara, T. R. (2014). Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciencia Rural**, 44(3), 453–460.

Choudhury, S.; Panda, P.; Sahoo, L.; Panda, S. K. (2013). Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. **Plant Signaling & Behavior**, 8(4), e23681.

Correia, N. M.; Durigan, J. C. (2004). Emergência de Plantas Daninhas em Solo Coberto com Palha de Cana-de-Açúcar. **Planta Daninha**, Viçosa- MG, 22(1), 11–17.

Corsato, J. M.; Fortes, A. M. T.; Porto, E. C.; Ribeiro, M. I.; Fruehwirth, M. (2016). Estresse oxidativo mediado por aleloquímicos e suas implicações na germinação e crescimento inicial de plantas. **Journal of Agronomic Sciences**, 5(5), 136–150.

Ewert, M.; Venturieri, G. A.; Steenbock, W.; Seoane, C. E. S. (2016). Sistemas agroflorestais multiestrata e a legislação ambiental brasileira: desafios e soluções. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, 36, 95–114.

Ferreira, A. G.; Aquila, M. E. A. (2000). Alelopatia: uma area emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12(Especial), 175–204.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto

Alegre: Artmed, 2004. 323p.

García-Sánchez, M.; Garrido, I.; Casimiro, I. J.; Casero, P. J.; Espinosa, F.; García-Romera, I.; Aranda, E. (2012). Defence response of tomato seedlings to oxidative stress induced by phenolic compounds from dry olive mill residue. ***Chemosphere***, 89(6), 708–716.

Lima, É. S.; Abdalla, D. S. P. (2001). Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. ***Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas***, 37(3), 293–303.

Mahdavia, F.; Saharkhiz, M. J.; Karami, A. (2017). Defensive response of radish seedlings to the oxidative stress arising from phenolic compounds in the extract of peppermint (*Mentha × piperita* L.). ***Scientia Horticulturae***, 214, 133–140.

Mattar, E. P. L.; Moraes, M. D.; Frade Junior, E. F.; Alécio, M. R.; Ortega, G. P. (2013). *Sistema de Cultivo em Aleias - Manual Técnico*. (V. S. Braga, Ed.). Cruzeiro do Sul, AC.

Meirelles, A. C.; Souza, L. A. G. (2015). Produção e qualidade da biomassa de leguminosas arbóreas cultivadas em sistemas de aleias em Latossolo Amarelo da Amazônia Central. ***Revista Brasileira De Agroecologia***, 10(2), 67–74.

Paes, L. S. O. P.; Araujo, C. B.; Boldrini, E. B. (2015). Sistemas Agroflorestais por Nucleação Primeiros Passos.

Prates, H. T.; Paes, J. M. V.; Pires, N. D. M.; Pereira Filho, I. A.; Magalhães, P. C. (2000). Efeito do extrato aquoso de leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira***, 35(5), 909–

914.

Rizzardi, M. A.; Neves, R.; Lamb, T. D.; Johann, L. B. (2008). Potencial alelopático da cultura da canola (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) na supressão de picão-preto (*Bidens* sp.) e soja. **R. Bras. Agroci**, 14(2), 239–248.

Sharma, P.; Jha, A. B.; Dubey, R. S.; Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, 1–26.

Silva, G. T. A.; Resende, A. S.; Campello, E. F. C.; Dias, P. F.; Franco, A. A. (2007). O Papel da Fixação Biológica de Nitrogênio na Sustentabilidade de Sistemas Agroflorestais. **Embrapa Agrobiologia**, 231.

Silva, P. S. S. (2012). Atuação dos aleloquímicos no organismo vegetal e formas de utilização da alelopatia na agronomia. **Biotemas**, 25(3), 65–74.

Silva Jr, J. F.; Klar, A. E.; Tanaka, A. A.; Freitas I. P.; Cardoso, A. E. I.; Putti, F. F. (2014). Tomato Seeds Vigor Under Water or Salt Stress. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, 8(1), 65–72.

Souza filho, A. P.; Dutra, S. (1998). Germinação de sementes de Calopogônio (*Calopogonium mucunoides*). **Pasturas Tropicales**, 20(3), 26–30.

Souza Filho, A. P. S.; Guilhon, G. M. S. P.; Santos, L. S. (2010). Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório: revisão crítica. **Planta Daninha**, 28(3), 689–697.

Ventura, A. C. S.S; da Silva, C. B.; Simionatto, E.; Burci, L. M.; de Oliveira, M.; Dalarmi, L.; Miguel, O. G.; Miguel, M. D.. (2016). Efeito fitotóxico do óleo volátil

de *Cleome guianensis* Aubl. sobre o crescimento inicial de *Senna occidentalis* L. ***Revista Brasileira de Plantas Medicinais***, 18(1), 349–355.

Anexo II

The journal *Anais da Academia Brasileira de Ciências* from 2012 onwards only considers online submissions. Once you have prepared your manuscript according to the instructions below, please visit the new, improved online submission website at <https://mc04.manuscriptcentral.com/aabc-scielo>. Please read these instructions carefully and follow them strictly. In this way you will help ensure that the review and publication of your paper are as efficient and quick as possible. The editors reserve the right to return manuscripts that are not in accordance with these instructions. Papers must be clearly and concisely written in English.

Aim and editorial policy

All submitted manuscripts should contain original research not previously published and not under consideration for publication elsewhere. The primary criterion for acceptance is scientific quality. Papers should avoid excessive use of abbreviations or jargon, and should be intelligible to as wide an audience as possible. Particular attention should be paid to the Abstract, Introduction, and Discussion sections, which should clearly draw attention to the novelty and significance of the data reported. Failure to do this may result in delays in publication or rejection of the paper. Articles accepted for publication become property of the journal.

Texts can be published as a review, a full paper (article) or as a short communication. Issues appear in March, June, September and December.

Types of Papers

Reviews

Reviews are published by invitation only. A proposal for a Review must be sent to the Editorial Office (aabc@abc.org.br), which will proceed accordingly.

Articles

Whenever possible the articles should be subdivided into the following parts: 1. Front Page; 2. Abstract (written on a separate page, 200 words or less, no abbreviations); 3. Introduction; 4. Materials and Methods; 5. Results; 6. Discussion; 7. Acknowledgments, if applicable; 8. References. Articles from some areas such as Mathematical Sciences should follow their usual format. In some cases it may be advisable to omit part (4) and to merge parts (5) and (6). Whenever applicable, the Materials and Methods section should indicate the Ethics Committee that evaluated the procedures for human studies or the norms followed for the maintenance and experimental treatments of animals.

Short communications

Short communications aim to report on research which has progressed to the stage when it is considered that results should be divulged rapidly to other workers in the field. A short communication should also have an Abstract and should not exceed 1,500 words. Tables and Figures may be included but the text length should be proportionally reduced. Manuscripts submitted as articles but found to fit these specifications will be published as short communications upon the author's agreement.

After the first screening, the articles will be evaluated by at least two reviewers, them being from educational and/or national and international research institutions, with proven scientific production. After due corrections and possible suggestions, the paper may be accepted or rejected, considering the reviews received.

We use the integrated Crossref Similarity Check program to detect plagiarism.

There are no APC and submission charges in the AABC.

Preparation of manuscripts

All parts of the manuscript should be double-spaced throughout. After acceptance, no changes will be made in the manuscript so that proofs require only corrections of typographical errors. The authors should send their manuscript in electronic version only.

Length of manuscript

While papers may be of any length required for the concise presentation and discussion of the data, succinct and carefully prepared papers are favored both in terms of impact as well as in readability.

Tables and Illustrations

Only high-quality illustrations will be accepted. All illustrations will be considered figures including drawings, graphs, maps, photographs as well as tables with more than 12 columns or more than 24 lines. Their tentative placement in the

text should be indicated. The AABC do not charge the first 5 figures in black and white or scale of gray. Should the authors want colored figures in the hard copy, a cost may be generated for each one of them, as well as for each figure in black and white or scale of gray beyond 5. Figures that are published in colors only in the online version do not generate additional costs.

Digitalized figures

Figures should be sent according to the following specifications: 1. Drawings and illustrations should be in format EPS (PostScript) or AI (Adobe Illustrator) and never be inserted in text; 2. Images or figures in grayscale should be in format TIF and never be inserted in text; 3. Each figure should be saved in a separate file; 4. Figures should be submitted at high quality (minimum resolution of 300dpi) at the size they are to appear in the journal, i.e., 8 cm (one column) or 16.5 cm (two columns) wide, with maximal height for each figure and respective legend smaller than or equal to 22 cm. The legends to the figures should be sent double-spaced on a separate page. Each linear dimension of the smallest characters and symbols should not be less than 2 mm after reduction; 5. Manuscripts on Mathematics, Physics or Chemistry may be typesetted in , or . The TEX, PDF and BIB files should be sent, and EPS files if there are any figures; 6. Manuscripts without mathematical formulae may be sent in RTF, DOC or DOCX.

Front page

The front page of the manuscript should present the following items: 1. Title of the article (the title should be short, specific, and informative); 2. Full name(s) of

the author(s); 3. Full professional address of each author (institution, street, number, zip code, city/county, state if applicable, country, etc.); 4. Key words (four to six in alphabetical order); 5. Running title (up to 50 characters); 6. Academy Section (one out of our 10 areas) to which the content of the work belongs; 7. Name and e-mail address of the author to whom all correspondence and proofs should be provided. Should any of these requirements not be met, we may unsubmit your paper and ask for corrections.

Acknowledgments

These should be included at the end of the text. Personal acknowledgments should precede those of institutions or agencies. Footnotes should be avoided; when necessary they must be numbered. Acknowledgments to grants and scholarships, and of indebtedness to colleagues as well as mention to the origin of an article (e.g. thesis) should be added to the Acknowledgments section.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at their first occurrence in the text, except for official, standard abbreviations. Units and their symbols should conform to those approved by the ABNT or by the Bureau International des Poids et Mesures (SI).

References

Authors are responsible for the accuracy of the References. Published articles and those in press may be included. Personal communications (Smith, personal communication) must be authorized in writing by those involved. References to

thesis, meeting abstracts (not published in indexed journals) and manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (Smith et al., unpublished data) and should NOT be included in the list of references.

The references should be cited in the text as, for example, 'Smith 2004', 'Smith and Wesson 2005' or, for three or more authors, 'Smith et al. 2006'. Two or more papers by the same author(s) in the same year should be distinguished by letters, e.g. 'Smith 2004a', 'Smith 2004b' etc. Letters should also distinguish papers by three or more authors with identical first author and year of publication. References should be listed according to the alphabetical order of the first author, always in the order SURNAME XY in which X and Y are initials. If there are more than ten authors, use et al. after the first author. References must contain the title of the article. Names of the journals should be abbreviated without dots or commas. For the correct abbreviations, refer to lists of the major databases in which the journal is indexed or consult the World List of Scientific Periodicals. The abbreviation to be used for the Anais da Academia Brasileira de Ciências is An Acad Bras Cienc. The following examples are to be considered as guidelines for the References.

REFERENCES

ALBE-FESSARD D, CONDES-LARA M, SANDERSON P AND LEVANTE A. 1984a. Tentative explanation of the special role played by the areas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. Adv Pain Res Ther 6: 167-182.

ALBE-FESSARD D, SANDERSON P, CONDES-LARA M, DELAND-SHEER E, GIUFFRIDA R AND CESARO P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. An Acad Bras Cienc 56: 371-383.

KNOWLES RG AND MONCADA S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J 298: 249-258.

PINTO ID AND SANGUINETTI YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus Theriosynoecum Branson, 1936 and validity of related Genera. An Acad Bras Cienc 56: 207-215.

Books and book chapters

DAVIES M. 1947. An outline of the development of Science. Thinker's Library, n. 120. London: Watts, 214 p.

PREHN RT. 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: NATIONAL CANCER CONFERENCE, 5, Philadelphia. Proceedings ... , Philadelphia: J. B. Lippincott, p. 97-104.

UYTENBOGAARDT W AND BURKE EAJ. 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

WOODY RW. 1974. Studies of theoretical circular dichroism of polipeptides: contributions of B-turns. In: BLOUTS ER ET AL. (Eds), Peptides, polypeptides and proteins, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.