

40629

ANGELA MARIA GATTÁS HALLAK

**EFEITO DE EXSUDATOS DE SORGO (*Sorghum bicolor* L.) SOBRE A  
DIVISÃO CELULAR E ANATOMIA DE PLÂNTULAS DE FEIJÃO  
(*Phaseolus vulgaris* L.).**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador**

Profa. Dra. LISETE CHAMMA DAVIDE

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1995

FICHA CATALOGRÁFICA PREPARADA PELA SEÇÃO DE CATALOGAÇÃO E  
CLASSIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFLA

Hallak, Angela Maria Gattás.

Efeito de exsudatos de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) sobre a divisão celular e anatomia de plântulas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). / Angela Maria Gattás Hallak.--Lavras : UFLA, 1996.

59p. : il.

Orientador: Lisete Chamma Davide.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Alelopatia. 2. Sorgoleone. 3. Ciclo mitótico. 4. Anatomia vegetal. 5. *Sorghum bicolor*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-581.15

-581.87322

-631.53

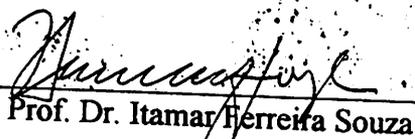
-635.652

ANGELA MARIA GATTÁS HALLAK

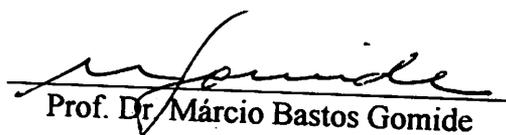
**EFEITO DE EXSUDATOS DE SORGO (*Sorghum bicolor* L.) SOBRE A  
DIVISÃO CELULAR E ANATOMIA DE PLÂNTULAS DE FEIJÃO  
(*Phaseolus vulgaris* L.).**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

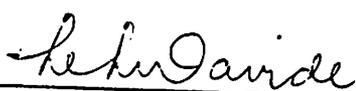
APROVADA em 14 de dezembro de 1995



Prof. Dr. Itamar Ferreira Souza



Prof. Dr. Márcio Bastos Gomide



Prof. Dra. Lisete Chamma Davide  
(Orientadora)

**Aos meus pais Acibio e Dalila pelo despreendimento e incentivo,**

**Aos meus irmãos e familiares pelo estímulo,**

**Aos meus sobrinhos José Vicente e Fernanda pelo apoio e dedicação,**

**A meu filho Bruno pela “força total”**

**Dedico a voces essa conquista que sozinha não teria alcançado.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecer não é somente dizer obrigado ou muito obrigado, mas reconhecer o apoio, a amizade, o estímulo e carinho das pessoas, a cada minuto de minha luta, diante do desânimo e da vontade de querer vencer. Não vencer uma competição mas um desafio, quando o tempo já se vai tão longe...

É grande o meu reconhecimento a cada um de vocês colegas, professores, amigos e familiares, que me ajudaram de maneiras diversas a conquistar e conduzir essa etapa em minha vida.

Aos meus orientadores, professores Lisete, Itamar e Manuel que simbolizam a dedicação, confiança, estímulo e paciência, só o muito obrigado seria pequeno diante de tanto apoio, por isso, dedico-lhes meu carinho, gratidão e reconhecimento.

Agradeço em especial às amigas Ana Hortência e Renata pela presença constante nesse caminhar.

Agradeço a contribuição dos colegas Cleber, Elifas, Eduardo, Maria Cristina, Angela, Leonardo, Patrícia, Geovanna, Juscélio e Francislei.

Meus agradecimentos aos funcionários da Biblioteca, APG, CPG e Central de Cópias pelo pronto atendimento e amizade.

Aos técnicos administrativos e laboratoristas do Departamento de Biologia pela prestação de serviço e carinho.

Aos professores com os quais tive a oportunidade do convívio e do aprendizado, o meu muito obrigado.

Aos colegas, professores e técnicos do Departamento de Ciências Naturais por compartilharem comigo dos imprevistos.

A Deus meu “amigo” de todas as horas por mais essa oportunidade de vivenciar essa etapa em minha vida. Obrigada Senhor, pela saúde, disponibilidade e proteção nas estradas.

Meus agradecimentos a FUNREI por ter acreditado no meu trabalho; a CAPES pelo PICDT, pela liberação da bolsa; a UFLA por ter me recebido, ampliando meus horizontes, na oportunidade de adquirir novos conhecimentos.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
RESUMO .....	viii
SUMMARY .....	x
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1 Alelopatia: histórico e conceitos, distinção de competição .....	3
2.2 Liberação de aleloquímicos pelos seres vivos .....	4
2.3 Sorgoleone: caracterização da molécula .....	8
2.4 Efeitos e modo de ação do sorgoleone .....	11
2.5 Espécies suscetíveis à ação do sorgoleone .....	13
2.6 Sorgoleone e strigol .....	16
2.7 Utilização de técnicas citogenéticas para avaliação de efeitos de substâncias sobre o ciclo celular .....	18
2.8 Utilização de técnicas anatômicas para avaliação do efeito de substâncias sobre a formação dos tecidos .....	22
2.8.1 Inibidores e mecanismos de ação dos reguladores de crescimento .....	22
2.8.2 Alterações físicas, químicas e metabólicas dos vegetais por ação dos reguladores de crescimento e mecanismo de ação dos compostos fenólicos .....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	26
3.1 Extração de sorgoleone .....	26
3.2 Diluição do sorgoleone .....	27
3.3 Aplicação dos tratamentos nas plântulas de feijão .....	27
3.4 Método citogenético .....	28
3.5 Método anatômico .....	29
3.6 Análise estatística .....	29

	Página
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	
4.1 Germinação das sementes de sorgo e produção de sorgoleone .....	31
4.2 Desenvolvimento das plântulas de feijoeiro .....	31
4.3 Efeito do sorgoleone sobre o ciclo celular .....	32
4.4 Análise anatômica do caule do feijoeiro .....	34
4.4.1 Descrição do corte transversal do caule de feijoeiro .....	44
4.5 Efeito do sorgoleone sobre o feijão .....	44
4.5 Efeito do sorgoleone sobre o feijão .....	50
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	53
<b>APÊNDICE</b> .....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1	O efeito do SGL sobre o desenvolvimento de várias espécies .....	33
2	Índice mitótico das fases da mitose (%), nas diversas concentrações de SGL e nos diferentes dias de coleta .....	36
3	Média de células em metáfase no 3º, 5º e 7º dias de tratamento com SGL e % de metáfases colchicínicas (MC) .....	39

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Plântula de feijoeiro com 14 dias. Seta indica a região onde foram realizados os cortes .....	30
2	Plântulas de feijoeiro submetidas às diversas concentrações de SGL, no 7 <sup>o</sup> dia de tratamento .....	33
3	Efeito das doses de SGL sobre o índice mitótico do feijoeiro .....	34
4	Efeito do tempo de tratamento do SGL sobre o índice mitótico do feijoeiro ...	35
5	Efeito das doses e tempo de tratamento do SGL sobre o ciclo celular do feijoeiro .....	37
6	Metáfases mitóticas do feijoeiro: metáfase normal (A) e metáfase colchicínica (B). Aumento total: 1.700X .....	40
7	Anomalias do ciclo celular do feijoeiro tratado com SGL. (A) telófase com ponte e (B) anáfase com cromossoma atrasado. Aumento total: 1.700X .....	41
8	Célula poliplóide. Aumento total: 1.700X .....	43
9	Esquema do corte transversal do caule de feijoeiro. Reduzido 40% .....	45
10	Corte transversal do caule do feijoeiro com 14 dias (testemunha). Aumento total: 1.700X .....	46
11	Corte transversal do caule do feijoeiro. Aumento total: 680X .....	47
12	Corte transversal do caule do feijoeiro com bainha amilífera descontínua. Aumento total: 680X .....	48
13	Corte transversal do caule do feijoeiro com xilema em forma alongada. Aumento total: 680X .....	49

## RESUMO

HALLAK, Angela Maria Gattás. Efeito de exsudatos de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) sobre a divisão celular e anatomia de plântulas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Lavras: UFLA, 1995. 59p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).\*

Foram instalados experimentos em casa de vegetação e laboratório, em 1994, na ESAL, atualmente UFLA, com o objetivo de testar a ação alelopática de exsudatos de raiz de sorgo sobre plântulas de feijoeiro. Sorgoleone (SGL), o principal produto coletado pelo processo de cloreto de metileno e ácido acético (Netzly et al., 1988), foi extraído das raízes de sorgo, variedade BR 601, 7 dias após a semeadura em placas de Petri e armazenado em geladeira. Soluções de 0 (testemunha); 0,01 ; 0,05; 0,10 e 0,15 mM de SGL foram preparadas, usando soluções de Hoagland e Johanson (Pizzolato e Regehr, 1978) como solventes. Plântulas de feijoeiro com 7 dias de idade, germinadas em vermiculita em casa de vegetação, foram transplantadas para estas soluções. O feijoeiro não mostrou sintomas visuais de fitotoxicidade durante o período de tratamento; porém, observações citogenéticas mostraram que concentrações de 0,01 mM e acima, reduziram o número de células nas fases de prófase, metáfase e anáfase se comparadas à testemunha. Entre as células em metáfase, observou-se metáfases colchicínicas, cujas percentagens no 3º e 5º dias de tratamento variaram com as concentrações de SGL; no 7º

---

\* Orientador: Lisete Chamma Davide. Membros da Banca: Itamar Ferreira Souza e Márcio Bastos Gomide.

dia, estes valores foram inversamente proporcionais às concentrações variando de 34,3% para 0,01 mM e 6,6% para 0,15 mM. Pode-se observar ainda nas células em anáfase, cromossomas em ponte, atrasados e células poliplóides.

Quanto à análise anatômica do feijão não foram observadas alterações nos tratamentos de 0,01 e 0,05 mM de SGL no 7º dia de tratamento. Entretanto, algumas alterações a nível de colênquima, parênquima cortical, feixe vascular e bainha amilífera foram observadas nos tratamentos de 0,10 e 0,15 mM de SGL.

## SUMMARY

### **EFFECT OF SORGHUM (*Sorghum bicolor* L.) EXUDATES ON BEAN SEEDLINGS (*Phaseolus vulgaris* L.) CELL DIVISION AND ANATOMY.**

One experiment was established at Lavras Federal University (UFLA) greenhouse and laboratory, in 1994, to test the allelopathic effects of sorghum, BR 601 variety, root exudates on bean seedlings. Sorgoleone (SGL) was extracted by dipping the sorghum roots in methylenum chloride and acetic acid. Hoagland and Johanson solutions of 0.00, 0.01, 0.05, 0.10 and 0.15 mM of SGL were used as substrates to growth 7 day-old bean plants. The beans did not show visual symptoms of phytotoxicity during the trial period; however, cytogenetic observations showed that concentrations of 0.01 mM and above, reduced the number of cells in the prophase, metaphase and anaphase stages in relation to the control without SGL. Among the cells in metaphase, it was noticed colchicinic effects at the third and fifth days after treatments with sorgoleone concentration dependent. On the seventh day, these results had inverse proportion to the SGL concentration varying from 34.3% with 0.01 mM and 6.6% with 0.15 mM. Within the cells in anaphase state it could be still noticed that the chromossomes bridged, laggard ones and polyploid cells. It was not observed any alterations in bean anatomy caused by the treatments of 0.01 and 0.05 mM of SGL on the seventh day. However, some changes in the level of chollenchyma, corticol parenchyma, vascular bundle and amyliferous sheath, have been noticed caused by the treatments of 0.10 and 0.15 mM of SGL.

## 1 INTRODUÇÃO

Os inibidores de germinação e crescimento de plantas de origem vegetal desempenham um papel de relevante importância no ambiente ecológico. Muitas plantas contêm estas substâncias nas folhas, raízes, frutos, flores ou sementes, as quais são liberadas para o solo, influenciando a germinação e o desenvolvimento de outras plantas vizinhas. A presença destes inibidores pode afetar a distribuição de certas espécies, favorecendo algumas e prevenindo a ocorrência de outras, de acordo com a sensibilidade destas espécies ao inibidor (Mayer e Poljakoff, citados por Dionello e Basta, 1984).

As relações ecofisiológicas têm sido estudadas por vários autores em diversas partes do mundo, ficando demonstrado serem elas capazes de alterar a estrutura, função e a diversidade de uma comunidade vegetal (Muller, citado por Dionello e Basta, 1984).

Substâncias vegetais que inibem a germinação ou crescimento de outras plantas, poderão, eventualmente, virem a ser substituídas eficazes para herbicidas sintéticos atualmente usados, dependendo da seletividade e toxicidade que apresentarem (Muller, citado por Dionello e Basta, 1984). As plantas sintetizam várias substâncias com a finalidade de preservar seu espaço vital impedindo o desenvolvimento de outras espécies tanto vegetal como animal, como por exemplo, insetos e nematóides (Garbs e Sinsbury, citados por Dionello e Basta, 1984).

Entre essas substâncias encontram-se os sorgoleones, que são hidroquinonas produzidas e exsudadas pela raiz de sorgo (*Sorghum bicolor* L.). Sorgoleones foram descobertos

em 1986 por Netzly e Butler na Universidade de Purdue, USA (Souza e Souza, 1991). Formas reduzidas e oxidadas comportam-se de maneiras diferentes, tanto estimulando como inibindo a germinação de plantas (Souza e Souza, 1991).

Lehle e Putnam (1983), já haviam verificado que extratos da parte aérea e raízes de várias espécies do gênero *Sorghum* são inibidores da germinação e crescimento de plântulas de um grande número de outras espécies. Estes autores mostraram que a ação inibitória de extratos aquosos de sorgo foi consequência de um complexo de componentes químicos, principalmente complexos fenólicos.

Panasiuk et al. (1986) observaram que várias espécies de plantas daninhas tiveram seus crescimentos inibidos quando incubados em placas de Petri com sementes de sorgo em germinação. Estes autores observaram também, sobre as mesmas plantas, efeitos inibitórios de lixiviados contidos dentro de potes plantados com sorgo e da água de um sistema onde raízes de sorgo se desenvolveram. Por outro lado, Einhellig e Rasmussen (1989) e Souza e Souza (1991) demonstraram que o sorgo não exerce influência no desenvolvimento da soja (*Glycine max* L.); não manifestou alteração morfológica quando submetida à ação de exsudatos de raízes de sorgo.

Para que os sorgoleones possam vir a ser utilizados como herbicida, torna-se necessário, verificar quais plantas têm seu desenvolvimento influenciado pelos exsudatos de sorgo. Propõe-se nesse trabalho, portanto, o estudo da influência do sorgoleone no comportamento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). A escolha desta espécie baseou-se no fato de tratar-se de uma leguminosa como a soja tendo em vista que esta cultura não apresentou efeitos tóxicos quando tratada com exsudatos de sorgo (Einhellig e Rasmussen, 1989, Souza e Souza, 1991), Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo analisar microscopicamente, o efeito de exsudatos de raízes de sorgo sobre o desenvolvimento do feijoeiro, através de métodos citogenéticos e anatômicos.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Alelopatia: histórico e conceitos, distinção de competição**

De acordo com Rice (1984), a capacidade de certas plantas influenciarem o desenvolvimento de outras foi registrada por Theophrastus (300 a.C.) e Democritus (500 a.C.).

Segundo o mesmo autor, o termo alelopatia foi primeiramente usado por Molisch (1937) para caracterizar qualquer efeito causado direta ou indiretamente por um organismo sobre outro, através de substâncias químicas por ele elaboradas e liberadas no ecossistema.

Tukey (1969) propõe que o termo alelopatia deve ser empregado para definir a influência de uma planta sobre a outra.

Putnam e Duke (1978) utilizaram o termo alelopatia para referirem-se aos efeitos injuriosos de plantas superiores de uma espécie (doadora), na germinação, crescimento ou desenvolvimento de plantas de outras espécies (receptoras).

De acordo com Rice (1984), alelopatia é qualquer efeito causado por uma planta, incluindo microorganismos, que direta ou indiretamente é prejudicial a outra planta através da liberação de compostos químicos no ambiente comum. Para Einhellig et al. (1982) e Lehle e Putnam (1983), citado por Einhellig e Rasmussen (1989) e alelopatia é a ação coletiva de vários compostos.

Algumas vezes o termo alelopatia pode ser confundido com competição. Segundo Szczepanski (1977) citado por Durigan e Almeida (1993), competição pode ser definida como a influência causada pelos organismos ao retirarem do ambiente elementos vitais como água, nutrientes e luz; baixando seu teor a níveis que prejudiquem o desenvolvimento normal dos outros seres.

## 2.2 Liberação de aleloquímicos pelos seres vivos

Os seres vivos vivem em comunidades dinâmicas cuja constituição é definida por fatores físicos (temperatura, luz, pressão atmosférica ...), fatores químicos (oxigênio, água, compostos orgânicos e inorgânicos ...) e pelas interações que ocorrem entre eles, a maioria das quais, ainda pouco conhecidas (Almeida, 1988).

As interações que se desencadeiam entre os indivíduos das comunidades foram definidas por Muller (1966), citado por Almeida (1988), como interferência.

Almeida (1988) menciona que os mecanismos alelopáticos e as alterações dos meios físicos ou biológicos atuam na natureza concomitantemente, sendo difícil distinguir e identificar os efeitos individuais, em virtude da complexidade biológica do processo.

- Os compostos químicos, quando liberados pelos organismos no ambiente, são conhecidos por substâncias alelopáticas, fitoalexinas, aleloquímicos ou produtos secundários (Carvalho, 1993).

Um dos maiores questionamentos é se os produtos secundários envolvidos são produtos finais no metabolismo celular ou se são sintetizados pela planta com função específica. Com relação a essa dúvida, há duas correntes. Muller (1966) e Whittaker (1970) defendem a

primeira hipótese com base no fato de que esses produtos se encontram em maior quantidade nos vacúolos das células, onde seriam depositados a fim de evitarem a sua própria autotoxicidade (Almeida, 1988). Essa teoria tem sido contestada por Swain (1977), pois segundo ele os produtos secundários, são produzidos nas células com uma finalidade específica e que a sua síntese obedece às leis da genética (Carvalho, 1993).

Segundo Medeiros (1989), muitos produtos secundários, oriundos de plantas com ação fitotóxica, têm sido isolados e identificados. A liberação destes compostos num agroecossistema pode ocorrer por: volatilização de substâncias provenientes de plantas em estado vegetativo; lixiviação, através da chuva ou sereno de toxinas solúveis em água da parte aérea ou de tecidos subterrâneos; de tecidos vegetais em decomposição; por exsudação do sistema radicular.

Vários experimentos registram efeitos alelopáticos. Elmer (1932) citado por Rice (1984), demonstrou que uma substância volátil liberada pela macieira (*Malus sylvestris*) e pereira (*Pyrus communis*), inibia o crescimento de brotos de batata (*Solanum tuberosum* L.). Rice (1984) cita que a florizina é um potente composto alelopático produzido no sistema radicular das macieiras.

Deuber (1992), verificou que deixando a palha de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) sobre o solo após a colheita, havia impedimento da emergência de plantas daninhas, devido a sua acentuada ação alelopática.

Por outro lado, podemos dizer que nem todas as substâncias liberadas pelas plantas são inibidoras; podem ser estimulantes para umas e inibidoras para outras plantas. Como substâncias estimulantes temos os nutrientes minerais, aminoácidos, ácidos orgânicos, carboidratos e hormônios de crescimento. As giberelinas estimulam o crescimento de ramos em

algumas plantas e inibem o florescimento em outras. As auxinas estimulam o alongamento de ramos e inibem gemas. Esses efeitos alelopáticos têm sido observados em árvores, arbustos e plantas herbáceas e as substâncias podem ser encontradas em folhas, caules, raízes, rizomas, flores, frutos e sementes, sendo que a folha parece ser a fonte mais consistente de inibidores (Rice, 1974).

A presença desses produtos nos seres vivos, de acordo com o biólogo norte-americano Tony Swain (1977), citado por Almeida (1990), constitui uma forma de comunicação, pois permite a eles a distinção entre os que lhes são prejudiciais e os benéficos ou indiferentes. Swain propôs em 1977 a teoria de que nas comunidades de seres vivos ocorre entre os vários elementos uma constante guerra química, a qual, em última análise, define constituição específica e quantitativa dessas mesmas comunidades. Almeida (1990) diz que atualmente são conhecidos cerca de dez mil produtos secundários com ação alelopática, o que é considerado apenas uma pequena parte da quantidade virtualmente existente na natureza.

Os compostos já identificados pertencem a diversos grupos químicos, atribuindo-se maior importância aos terpenóides, esteróides, alcalóides, cianohidrinias, ácidos graxos de cadeia longa, poliacetilenos, lactonas insaturadas, taninos, derivados do ácido benzóico e do ácido ciânico, fenóis, cumarinas e flavonóides. Alguns são voláteis, como certos terpenóides e poliacetilenos, mas a maior parte é liberada na forma de solutos aquosos. A alelopatia raramente é provocada por uma única substância, sendo comum que o efeito se deva a um conjunto de substâncias. Os efeitos dependem ainda das condições ambientais, como umidade, temperatura e outras (Almeida, 1990).

A forma de atuação dos compostos alelopáticos também não é específica. Cada um pode afetar mais de uma função nos organismos em que atua e, a intensidade depende da

concentração do composto, da facilidade de translocação e da rapidez com que a planta irá degradar o referido composto. As funções prejudicadas com maior frequência por esses compostos são a assimilação de nutrientes, o crescimento, a fotossíntese, a respiração, a síntese de proteínas, a permeabilidade da membrana celular e atividade enzimática (Almeida, 1990).

Identificar essas substâncias, em diversas culturas, auxilia os especialistas em melhoramento genético na criação de genótipos mais resistentes a bactérias, fungos e insetos (Almeida, 1990). Os compostos alelopáticos responsáveis pela proteção contra bactérias e fungos localizam-se principalmente na epiderme dos órgãos. Quando a célula é atingida por um patógeno, seu metabolismo é alterado, desencadeando a síntese de produtos secundários e aumentando a concentração destes no local afetado (Almeida, 1990).

Dentre as culturas em que se tem encontrado maior inibição das plantas daninhas estão: sorgo, trigo, arroz, aveia e cevada (Putnam e De Frank, 1983).

A alelopatia pode contribuir para justificar a agressividade de plantas presentes nas culturas (Carvalho, 1993).

Aleloquímicos fitotóxicos, estão implicados numa grande diversidade de efeitos prejudiciais nas plantas. Estes efeitos incluem: atraso ou inibição completa de germinação de sementes, crescimento paralisado, injúria ao sistema radicular, clorose, murcha e morte das plantas (Patrick et al., 1964-1965 ; Rice, 1974, citados por Patrick, 1986).

Substâncias fitotóxicas podem inibir o crescimento miceliano, motilidade de zoosporos e germinação de propágulos infectivos de *Aphanomyces euteiches* e impedir a podridão da raiz da ervilha (*Pisum sativa* L.) (Lewis et al., 1971 ; Papavizas et al, 1980, citado por Patrick, 1986).

Patrick (1986) concluiu seus trabalhos dizendo que compostos aleloquímicos têm amplo espectro de efeitos e atividades e que os compostos fitotóxicos podem predispor doenças de plantas. Outros podem agir como agentes anti-microbianos protegendo organismos contra doenças.

Os dois aspectos da alelopatia em doenças de plantas têm recebido pouca atenção na literatura de patologia de plantas, uma vez que os patologistas não dão atenção aos mecanismos alelopáticos. Há, portanto, a necessidade de mais pesquisas nessa área.

Muller (1964) menciona que *Salvia leucophylla*, *Salvia mellifera* e *Salvia apiana* produzem inibidores voláteis os quais afetam outras plantas superiores. Backer (1966) demonstrou que compostos voláteis, produzidos por *Eucalyptus globulus* Labill, são potentes inibidores de crescimento de raízes de plantas do gênero *Cucumis* (citados por Medeiros, 1989).

### 2.3 Sorgoleone : caracterização da molécula

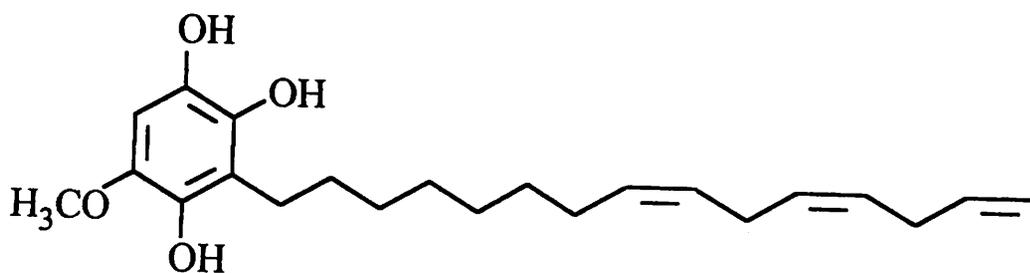
Breazeale (1924) relata que quando palha de sorgo é incorporada ao solo onde serão plantados outros cereais, um efeito nocivo é quase sempre observado, o qual é mostrado através de uma pobre condição vegetativa nos primeiros estágios de crescimento. Este efeito poderia ser devido a duas causas: a primeira, o sorgo exsuda substâncias tóxicas no solo e, a segunda, o sorgo extrai do solo algum nutriente essencial ao crescimento do cereal.

Esta dúvida foi sanada por Guenzi e McCalla (1966b) citado por Netzly e Butler (1986) e Guenzi, McCalla e Norstadt (1967), os quais constataram que o sorgo contém várias substâncias hidrosolúveis que inibem o crescimento de plântulas e a germinação de sementes de

outras espécies e, que os compostos fitotóxicos poderiam permanecer no solo pelo menos por 28 semanas.

Netzly e Butler (1986), através de testes químicos e técnicas cromatográficas, como cromatografia de camada fina (TLC) encontraram nos exsudatos hidrofóbicos, gotículas de pigmento amarelo cuja tonalidade variava de amarelo a vermelho púrpuro, dependendo do pH. Além dos pigmentos, encontraram também proteínas, lípides, aminoácidos livres, fenóis e quinonas não identificadas. Neste trabalho eles constataram que das 25 cultivares de sorgo estudadas, todas exsudaram gotículas hidrofóbicas amarelas no ápice dos pelos radiculares. Não houve diferença qualitativa nas gotículas de sorgo em 6 cultivares.

Netzly et al. (1988), tendo concluído suas análises através de espectrometria, verificaram que essas gotículas amarelas exsudadas pela raiz do sorgo correspondiam a um composto novo: 2-hydroxy, 5-metoxy, 3 [(8'Z, 11'Z)- 8',11', 14'- pentadecatriene] - p-benzoquinone, o qual foi denominado de sorgoleone e cuja estrutura química encontra-se a seguir:



Segundo Einhellig e Souza (1992), o exsudato inicial consiste de hidroquinonas que se oxidam facilmente a quinonas mais estáveis. O sorgoleone após a oxidação é o principal componente fitotóxico hidrofóbico no exsudato da raiz do sorgo (Einhellig et al., 1993).

◦ A observação de exsudatos hidrofóbicos através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) revelou um componente principal e cinco secundários (Y-2, Y-3, Y-4, Y-5 e Y-6 ). Todos com espectros visíveis idênticos ao do pigmento amarelo detectado pela cromatografia de camada fina (Nip e Burns, 1969-1971; Stafford, 1966-1969; Yasumatsu et al., 1965 citados por Netzly e Butler, 1986).

◦ Segundo Netzly et al. (1988), sorgoleone não foi encontrado em exsudatos de raiz de milheto (*Pennisetum americanum* L.), milho (*Zea mays* L. ), trigo (*Triticum aestivum* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), feijão (*Phaseolus aurens* L.) ou centeio (*Secale cereale* L.). Esses autores, comparam o sorgoleone ao strigol, que é um estimulante de crescimento.

◦ A identificação de aleloquímicos do sorgo como de outras plantas, é altamente desejável para possível implementação como herbicida específico para determinadas espécies ou como reguladores de crescimento (Putnam e De Frank , 1983).

Segundo descrição de Rasmussen et al. (1992), exsudatos de raízes de sorgo contêm várias substâncias tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, que apresentam efeitos alelopáticos. Esses autores, citam Kuntz quando se refere que sorgoleone antes de oxidar é estimulante na germinação da *Striga asiatica* L.

O sorgoleone foi o primeiro estimulante de germinação da *Striga* sp. derivado de hospedeiro, a ser identificado com pouca solubilidade em água (Chang et al., 1986; Netzly e Butler, 1986 ; Netzly et al., 1988).

A forma ativa do sorgoleone foi constatada ser a de hidroquinona instável, que foi rapidamente oxidada a quinona inativa (Siame et al., 1993).

## 2.4 Efeitos e modo de ação do sorgoleone

Einhellig (1986), citado por Rasmussen (1992), menciona que os aleloquímicos interferem nos fitohormônios, relação planta-água, nutrição-mineral, função dos estômatos, fixação e distribuição de CO<sub>2</sub> e respiração.

Einhellig (1987), citado por Einhellig e Rasmussen (1989), diz que para que o sorgo exerça influência, o solo não pode ter nenhum tipo de preparo.

Einhellig e Rasmussen (1989), acreditam que o uso planejado de uma cultura de sorgo granífero como um recurso para o manejo de plantas daninhas poderia reduzir o uso de herbicida.

Cai et al., (1993), observaram diferenças morfológicas de raízes cultivadas de sorgo entre os dois tipos de genótipos SRN39 e IS4225 mas não conseguiram explicar os mecanismos que controlam essas diferenças.

A condição alelopática do sorgo como planta doadora é o maior fator de inibição de plantas daninhas (Einhellig e Rasmussen, 1989).

Condições ambientais influenciam a alelopatia do sorgo. O nível de acúmulo de muitos aleloquímicos fenólicos e de cumarinas em uma planta é influenciado por sua idade, intensidade luminosa e várias condições de estresse (Woohead, 1981; Lehle e Putnam, 1982 citados por Einhellig e Rasmussen, 1989).

Netzly e Butler (1986) obtiveram resultados indicando que os exsudatos hidrofóbicos de raízes de sorgo contêm componentes que podem ter atividades biológicas que dependem em muito da espécie testada. Einhellig e Souza (1992) observaram ação inibitória de sorgoleone no crescimento e teor de clorofila de lentilha d'água (*Lemna minor*) e na fotossíntese

de soja, em concentração de 0,10 mM. Concentrações de 0,05 mM foram suficientes para inibir o crescimento de *Abutilon theophrasti* e *Setaria viridis*.

Einhellig et al. (1993), sugeriram que o sorgoleone possa também interferir no processo da fotossíntese. Estes autores demonstraram que 50 e 100  $\mu\text{M}$  de sorgoleone bloquearam a fotossíntese e que 10  $\mu\text{M}$  demonstrou reduzir a atividade fotossintética a um nível de 50%, em plantas de ervilha (*Pisum sativa* L.) em relação ao controle. Essa influência foi medida pela taxa de liberação de oxigênio. O isolamento de cloroplastídeos de ervilha também mostrou que o sorgoleone interfere no mecanismo de fotossíntese. Relatam ainda que concentrações de 0,1 e 1,0  $\mu\text{M}$  reduzem a liberação de oxigênio dependente de  $\text{CO}_2$  pelo cloroplastídeo com  $I_{50}$  aproximadamente de 0,2 mM isto é, a concentração com a qual o SGL inibe 50% da fotossíntese.

Tudo indica, portanto, segundo Rasmussen et al. (1992), que o sorgoleone impede a fotossíntese e inibe a função mitocondrial interferindo no crescimento das plântulas. Segundo Einhellig et al. (1993), a atrazine ( $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{ClN}_5$ ) que é um inibidor de fotossíntese, e, nas mesmas concentrações, tem o mesmo efeito do sorgolone.

Há uma semelhança estrutural entre SGL e a coenzima Q, que é um intermediário na cadeia de transporte de elétrons e isso levou Rasmussen et al. (1992), investigarem os possíveis efeitos do sorgoleone sobre a respiração. Os autores observaram que ocorre o bloqueio do fluxo de elétrons entre o citocromo b e o complexo  $\text{C}_1$ . O sorgoleone inibe a absorção de oxigênio por mitocôndrias isoladas bloqueando o fluxo de elétrons no sistema mitocondrial de transporte de elétrons.

Segundo Einhellig e Souza (1992), o efeito inibidor do sorgoleone já foi demonstrado em plantas daninhas que permaneceram entre duas safras de sorgo. Observaram

também que diferentes proporções provocam diferentes efeitos sobre: *Abutilon theophrasti*, *Datura stramonium*, *Amaranthus retroflexus*, *Setaria viridis*, *Digitaria sanguinalis* e *Echinochloa crusgalli*. Com 125  $\mu\text{M}$ , ocorre a redução da elongação da radícula; *Eragrostis tef* 50  $\mu\text{M}$ , impede o crescimento e *Lemna minor* 10  $\mu\text{M}$ , reduz o crescimento de todas as plantas testadas. Não foi testado sorgoleone abaixo de 10  $\mu\text{M}$ , mas os dados sugerem que o limite mínimo para o crescimento pode estar abaixo desse nível. Os mesmos autores verificaram ainda que sorgoleone não tem ação na germinação nas primeiras 24 horas, mas a elongação da radícula foi impedida quase que completamente com 250  $\mu\text{M}$  com 48 horas e com 125  $\mu\text{M}$ , o comprimento da radícula foi a metade do controle. Desta forma, os autores concluíram que o sorgoleone atinge gramíneas e plantas de folhas largas, indicando apresentar efeitos não seletivos e sugerem que será necessário testá-lo com maior número de espécies para confirmar a falta de seletividade.

## 2.5 Espécies suscetíveis à ação do sorgoleone

Netzly e Butler (1986) e Netzly et al. (1988) relatam que exsudatos da raiz do sorgo inibem a elongação da raiz da alface (*Lactuca sativa*) em 85% e não afetam o milho (*Zea mays* L.).

Einhellig e Rasmussen (1989) referem-se ao sorgo quando dizem que ele inibe mais plantas daninhas de folhas largas do que as folhas estreitas.

O sorgo inibiu até 40% do crescimento de plantas daninhas e isso é atribuído ao efeito alelopático (Putnam e De Frank, 1983, citado por Einhellig e Rasmussen, 1989).

Weerasuriya et al. (1993) concluíram que exsudatos da raiz do sorgo tanto podem inibir como estimular a germinação de semente de *Striga*.

Compostos fitotóxicos poderiam permanecer no solo pelo menos 28 semanas (Guenzi e McCalla, 1966b e Guenzi et al., 1967 citados por Einhellig e Rasmussen., 1989).

Após extração aquosa de SGL, Lehle e Putnam(1983), encontraram atividade inibitória em frações químicas de *Lepidium sativum*.

Sorgo pode ser usado como uma alternativa de herbicida (Einhellig e Leather, 1988 citados por Einhellig e Rasmussen., 1989). Há evidências que o plantio no resíduo de cultura de sorgo pode controlar plantas daninhas. A eliminação de plantas daninhas foi observada quando alfafa (*Medicago sativa*) semeada no outono segue sorgo semeado no verão (Forney et al., 1985 citado por Einhellig e Rasmussen, 1989).

Einhellig e Rasmussen (1989), em 3 anos de estudos, demonstraram que a natureza das culturas (espécies) em um ano influenciou o crescimento de plantas daninhas no outro ano. Onde havia sorgo, foi notada a redução de plantas daninhas.

Uma plantação feita em 1984 com faixas de sorgo e soja foi analisada no ano seguinte, verificando-se que a soja estava completamente verde e onde havia sorgo, estava sem vegetação. A biomassa de plantas daninhas foi bem menor nas faixas de sorgo (Einhellig e Rasmussen, 1989).

Foi acrescentado cultura de milho nas faixas, de modo que concentrações fossem feitas com uma cultura onde não houvesse dúvida sobre os efeitos da fertilidade do nitrogênio residual e verificou-se que o crescimento de plantas daninhas foi significativamente mais baixo em faixas, onde o sorgo havia sido cultivado do que nas faixas onde havia milho e soja. Áreas de

milho apresentaram maior biomassa de plantas daninhas do que as áreas de sorgo ( Einhellig e Rasmusen, 1989).

Guenzi, McCalla e Norstadt (1967) verificaram o efeito de extratos aquosos de partes de trigo, aveia, sorgo e milho sobre o crescimento de plântulas de trigo. De um modo geral, extratos de sementes causaram menor efeito e os de caule maior efeito inibitório sobre as plântulas de trigo. Os extratos de milho e trigo foram mais tóxicos para o milho enquanto que o trigo teve seu desenvolvimento mais afetado pelos extratos de aveia e sorgo. Substâncias fitotóxicas persistem em resíduos de culturas avaliadas durante a decomposição. A fitotoxicidade de resíduos de sorgo em decomposição variou consideravelmente de 1963-1964; em 1963, o tempo seco e muito mais quente do que o normal provocou maior toxicidade no solo. Ao contrário, em 1964, os dados mostraram uma tendência geral de um decréscimo contínuo na toxicidade, à medida que a decomposição se processou.

Segundo Netzly et al. (1988), com 4 µg de sorgoleone por placa de Petri e em pH 5.5 não houve diferença significativa no alongamento das raízes de alface ; já em pH 7.5, foram notados um leve aumento nas raízes de alface e uma inibição nas raízes de caruru (*Amaranthus retroflexus* L).

• São fatores importantes para determinar a severidade da atividade do herbicida o pH e a concentração. A atividade herbicida do exsudato hidrofóbico de sorgo (*Sorghum bicolor* L.), foi devido a inibição dependente de concentração e pH, do alongamento da raiz em algumas, porém, não em todas as plantas daninhas testadas. Sorgoleones são também ativos como alérgenos de contato; provocando erupção na pele. As formas de hidroquinonas do sorgoleone proporcionam um novo modelo molecular, de estrutura simples, que promovem a

germinação de planta daninha. Apenas sua solubilidade e estabilidade, parecem limitar sua aplicação como substância química de controle (Netzly et al., 1988).

Segundo Souza e Souza (1991) o sorgoleone exerce influência no caruru tendo sido observados sintomas drásticos que levaram a plântula à morte.

## 2.6 Sorgolactone e strigol

Após a identificação do sorgoleone como um exsudato da raiz do sorgo, Hauck, Muller e Schildknecht (1992), verificaram um outro composto o qual foi denominado de sorgolactone.

O sorgo exsuda também através da raiz, o strigol, o qual é encontrado no algodão (*Gossypium hirsutum* L.), milho (*Zea mays* L.) e milheto (*Pennisetum americanum* L.) (Siame et al., 1993).

A striga (*Striga asiatica*) é sem dúvida uma das plantas parasitas mais nocivas. Causa perdas de rendimento até 70% no sorgo, milho e milheto (Cook et al., 1966 e 1972; Hess, Ejeta e Butler, 1991).

Um dos mecanismos básicos através dos quais as plantas de sorgo poderiam evitar o parasitismo da *Striga hermonthica*, seria através de uma baixa produção de estimulantes de germinação (Saunders, 1933; Kumar, 190; Willians, 1959 citados por Olivier, Benhamou e Leroux, 1991).

O sorgoleone inibe a germinação de sementes, desenvolvimento de plântulas e pode não interferir em outras espécies; mas pode também estimular a germinação como acontece com a *Striga asiatica* (Souza e Souza, 1991; Weearasuriya et al., 1993).

Outras substâncias também podem estimular a germinação da *Striga* sp. como etileno (Egley e Dale, 1970), ácido sulfúrico (Egley, 1972) citados por Siame et al. (1993) e o cloreto de sódio (Hsiao, Worsham e Moreland, 1981).

Para Hauck, Muller e Schildknecht (1992), o sorgolactone difere do strigol por não possuir um grupo metil e a hidroxila; é provável que o principal estimulante produzido pelo sorgo, seja o sorgolactone.

A primeira molécula natural descrita a estimular a germinação de striga foi o strigol, substância alelopática isolada da raiz do algodão que não é um hospedeiro, induzindo 50% da germinação de *Striga asiatica* na concentração de  $10^{-11}$ M, sendo considerado muito ativo (Cook et al., 1966 e 1972).

A *Striga hermonthica* causa perda substancial de rendimentos em todas as áreas produtoras de sorgo nos trópicos subúmidos, principalmente onde o período de pousio foi reduzido (Sallé e Raynal-Roques, 1989, citados por Carsky et al., 1994).

Segundo Sauerborn (1991), citado por Cechin e Press (1994), a *Striga* é o gênero mais importante de planta daninha que infesta sorgo, milho, arroz (*Oryza sativa*), cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) e cowpea (*Vigna unguiculata* L.), principalmente no oeste e leste da África e Ásia. Esta planta pode reduzir o rendimento do hospedeiro virtualmente a zero. As perdas de rendimento em culturas infestadas diferem entre as cultivares e também entre as origens da striga que as infecta, mesmo em condições ambientais semelhantes. A *Striga hermonthica* tem um alto nível de diversidade genética, mesmo em comparação com espécies que tenham as mesmas características históricas. (Bharathalakshmi et al., 1990 citados por Cechin e Press, 1994).

## 2.7 Utilização de técnicas citogenéticas para avaliação de efeitos de substâncias sobre o ciclo celular

O desenvolvimento de uma planta envolve o crescimento e a diferenciação. A mitose leva ao crescimento pelo aumento do número de células. Fatores ambientais que afetam a divisão celular, afetarão o desenvolvimento do indivíduo. Dessa forma a análise citogenética é uma das maneiras que propicia a avaliação do efeito de determinadas substâncias sobre o desenvolvimento de uma planta. Essa avaliação pode ser feita através da observação de fases das divisões celulares (mitose e meiose) que permitem verificar a ocorrência de alterações no ciclo celular e no número, estrutura e comportamento dos cromossomas.

O sorgoleone inibe o alongamento de raízes de plantas de alface e o crescimento de várias outras espécies indicando que trata-se de um composto que pode causar efeitos prejudiciais às divisões celulares.

Vários trabalhos têm sido realizados para demonstrar o efeito de substâncias sobre o ciclo celular. Spanó e Takahashi (1981) analisaram os efeitos do niridazole, droga utilizada no tratamento da esquistossomose, a nível gênico, cromossômico e sobre o índice mitótico. Os autores observaram que apesar da droga não ter induzido mutações gênicas em *Drosophila*, em altas concentrações, aumentou significativamente o número de aberrações cromossômicas em células de medula óssea de ratos e diminuiu acentuadamente o número de células em divisão de cebola (*Allium cepa*).

Segundo Harris (1979), Murray-Lyon e Reynolds (1979), citados por Antunes e Takahashi (1994), o mebendazol (MBZ), que é anti-fúngico, anti-helmíntico e anti-neoplásico, aparentemente afeta a função celular em sítios associados com as estruturas e mecanismos

responsáveis pela divisão celular de modo que células em divisão tenderiam a ser danificadas pelo medicamento. Baseados nesta suposição, Antunes e Takahashi (1994) analisaram seus efeitos citogenéticos sobre sistemas de mamíferos *in vivo* e *in vitro*. Verificaram que o MBZ não induziu um aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas, mas os resultados obtidos mostram que essa droga é eficiente em bloquear o ciclo celular em metáfase.

É comum que a população se utilize de plantas medicinais para a automedicação. Dias e Takahashi (1994) alertam que há necessidade de certos cuidados, pois essas plantas poderão ser prejudiciais à saúde. Estes autores utilizaram dois sistemas biológicos (medula óssea de ratos Wistar e células meristemáticas de cebola) para verificar o efeito dos extratos aquosos de duas plantas medicinais (*Alpina nutans* e *Pogostemum heyneanus*). Não foi verificado efeito sobre os linfócitos de rato, mas houve efeito sobre as células meristemáticas de cebola. O efeito citotóxico, no entanto, desapareceu gradualmente à medida que os bulbos de cebola eram recolocados na água. A ação sobre a divisão celular segundo os autores, provavelmente tenha resultado de uma ação tóxica reversível do extrato. A ausência de aberrações estruturais tipo quebra também sugere que os extratos agem exclusivamente como um agente tóxico sobre a formação do fuso mitótico, com nenhuma ação química sobre o DNA ou sobre o complexo DNA-proteína.

× No trabalho realizado por Sereno et al. (1981), no qual foi analisado o comportamento meiótico da cultivar de trigo Cinquentenário (C15), após a aplicação de inseticidas e fungicidas em experimento a campo, notou-se que houve maior frequência de anomalias no pólen das espigas provenientes de plantas tratadas, indicando o efeito prejudicial dos defensivos. O mesmo resultado foi obtido no estágio de metáfase II onde houve maior incidência de distúrbios de condensação. Entretanto, na análise das outras fases da meiose, as

plantas não tratadas revelaram maior incidência de anomalias que aquelas tratadas. De acordo com os autores, estes resultados poderiam ser explicados supondo-se que os defensivos provocassem anomalias nas células mães que originaram os grãos de pólen analisados. Nas células mães de pólen formadas após a degradação dos defensivos essas anomalias poderiam ser menos prejudiciais.

Samperiz e Blumen (1984) encontraram evidências de que a colchicina, além de dissociar os microtúbulos do fuso mitótico de células em proliferação, afeta outras funções celulares que são dependentes, direta ou indiretamente, dessas estruturas. O efeito da colchicina no ciclo celular e na velocidade de migração dos ameloblastos ao longo do órgão do esmalte, em incisivos inferiores de camundongo, foi estudado radioautograficamente através da incorporação de timidina tritiada naquelas células. Com base nos resultados obtidos, os autores puderam verificar que no grupo de animais tratados com colchicina houve uma diminuição das fases da intérfase ( $G$  13,6 h e  $G_1$  13,7 h). A diminuição de  $G$  pode ter sido determinada pelo aumento do número de ameloblastos em metáfase, como consequência do final de ação da droga, em que as células bloqueadas recuperaram sua capacidade de divisão e prosseguiram através do ciclo. Já a diminuição de  $G_1$  pode ter sido decorrente dessa diminuição de  $G$ , uma vez que a duração desse tempo foi calculada indiretamente (Samperiz e Blumen, 1984).

A descoberta no início dos anos 40 de reguladores de crescimento de plantas que podiam matar ervas daninhas eficientemente, teve um impacto importante na agricultura moderna.<sup>X</sup> Os herbicidas hormonais ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) têm sido os herbicidas mais amplamente usados desde sua introdução logo após a 2ª Guerra Mundial (Turkula e Jalal, 1985). O potencial de danos genéticos por esses herbicidas continua a ser uma séria preocupação. O efeito mutagênico refletido pelas

taxas de trocas de cromátides irmãs, foi determinado em cultura de linfócitos humanos. Os dados foram baseados na análise de 50 células para o controle em cada um dos 3 tratamentos. Uma dosagem de 50 µg/ml causou um efeito altamente significativo na troca entre cromátides irmãs (SCE); dosagens de 100 e 250 µg/ml elevaram a taxa de SCE, porém, não significativamente. Como o 2,4-D é biodegradado rapidamente no solo e na água, seu uso contínuo não é seriamente questionado enquanto não se descobre compostos mais seguros. Entretanto, os resultados desse estudo sugerem que o risco de danos genéticos pela exposição direta a amostras comerciais de 2,4-D não deve ser ignorado. Em dosagens acima de 50 µg/ml uma alta proporção das células pode ser tão severamente afetada que ou não entram em divisão ou não conseguem sobreviver.

∧ Analisando o efeito da pesticida (1,2) e (3,4) sobre a viabilidade do pólen de *Crepis tectorum*, Kurinnyi (1983) concluiu que este pesticida causou 31% de esterilidade de pólen. Afirmou que a poluição ambiental por pesticidas mutagênicos apresenta efeitos gametocídicos nas plantas.

∧ Segundo Pilinskaya e Stepanova (1984), o inseticida furadan provoca efeito da biotransformação sobre a atividade citogenética *in vivo* e *in vitro*. A pesquisa foi desenvolvida em medula óssea de camundongos e em células periféricas de linfócitos humanos. A dose e a concentração máximas estudadas das substâncias testadas, reduziram o índice mitótico em não mais do que a metade, o que tornou possível analisar o número de metáfases. Furadan, em doses de 1,0 e 0,1 mg/Kg, não causou um aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas em células da medula óssea de camundongos, mas induziu efeitos citogenéticos na cultura de linfócitos humanos e em concentrações de 300 a 100 µg/ml induziu um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da frequência de metáfases aberrantes, comparado com o controle. As

aberrações cromossômicas que predominaram foram fragmentos acêntricos isolados e aos pares que compuseram, respectivamente, 66 e 30% do número total de aberrações.

Avaliações citogenéticas também podem ser utilizadas para demonstrar o efeito de infestações por fungos como mostra o trabalho a seguir. Plantas de uma mesma variedade de cevada foram inoculadas com *Septoria nodorum* Berk., *Septoria tritic* Rob., *Helminthosporium sativum* Pam., King e Bakke, e infestadas com pulgões (*Metopolodium dirhodum* Walker) infectados com o vírus do nanismo amarelo da cevada (Barley Yellow Dwarf Virus). Espigas de uma mesma planta, após a inoculação, apresentaram até 80 vezes mais anormalidades do pólen quando comparadas aos resultados obtidos antes da inoculação, indicando que a maior incidência de anomalias na divisão meiótica das plantas poderia ser determinada pelo ataque de moléstias fúngicas de espiga e pragas.

## **2.8 Utilização de técnicas anatômicas para avaliação de efeito de substâncias sobre a formação dos tecidos**

### **2.8.1 Inibidores e mecanismos de ação dos reguladores de crescimento**

*Os inibidores de crescimento são substâncias reguladoras que retardam os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, tais como o alongamento de raízes e caules, a germinação de sementes e o brotamento de gemas. Eles também são capazes de reprimir o crescimento de segmentos isolados de caule e podem agir como antagonistas de promotores de crescimento, como as auxinas, giberelinas e citocininas.*

*Verificou-se que as cumarinas (derivadas do ácido cinâmico) também se comportam como inibidores de crescimento. Há inibidores de crescimento naturais, de natureza fenólica (Ferri, 1979, p.193).*

*Os reguladores de crescimento podem atuar sobre muitos fenômenos do desenvolvimento das plantas. Devido à grande influência dos reguladores sobre esses fenômenos e à maneira ordenada e precisa com que eles se sucedem, surge um grande interesse em entender os mecanismos pelos quais esses processos são desencadeados e conduzidos. Ou seja, faz-se necessário entender como os reguladores atuam ao nível molecular (Ferri, 1979, p.213).*

### **2.8.2 Alterações físicas, químicas e metabólicas dos vegetais por ação dos reguladores de crescimento e mecanismo de ação dos compostos fenólicos**

A célula vegetal é constituída de estruturas subcelulares que desempenham as mais variadas funções e a cada uma dessas estruturas está associada uma série de componentes químicos e processos metabólicos, que, em última instância, lhe conferem propriedades físicas e químicas.

A ação dos reguladores de crescimento pode, portanto, provocar mudanças físicas diretas nas estruturas celulares ao interagir com elas ou, indiretamente, interferindo com o (s) caminho(s) metabólico (s) que conduzem a um determinado tipo de estrutura.

A célula vegetal é envolvida por uma parede celular, a qual pode sofrer modificações por ação de reguladores de crescimento que interfiram com fenômenos de expansão celular. A membrana plasmática também constitui um sítio de ação hormonal, especialmente nos fenômenos que envolvem mudanças de permeabilidade ou liberação de

substâncias a ela ligadas. Os reguladores podem agir também sobre as organelas, suas membranas, que são semelhantes à membrana plasmática ou alterando os processos metabólicos específicos que essas organelas desempenham (Ferri, 1979).

As substâncias alelopáticas liberadas pelas plantas, pertencem principalmente, a um único grupamento químico, os compostos fenólicos, geralmente na forma de ácidos. Muitas vezes são produzidos outros compostos como isoflavonóides e alcalóides, que ao degradarem no solo, são transformados em ácidos fenólicos. Dentre estes, os mais frequentemente encontrados são: ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido p-hidroxibenzóico-acético, ácido salicílico. É interessante lembrar que a esse grupo de compostos, pertence uma das categorias de herbicidas mais usados na agricultura, a dos fenoxi derivados. O herbicida hormonal mais popular é o 2,4-D (ácido 2, diclorofenoxiacético) (Tamura, Chang e Suzuki, 1969 e Chou e Patrick, 1976).

Dentre os compostos fenólicos, a cumarina foi apontada como um inibidor específico da síntese de celulose em plantas superiores (Ferri, 1979).

× Sabe-se que hoje em dia há necessidade de utilização de herbicidas nas plantações para evitar danos causados por plantas daninhas, mas na maioria das vezes acabam sendo prejudiciais à saúde, além de modificar o sabor dos alimentos. O ideal seria utilizar herbicidas naturais como o SGL para sanar o prejuízo dos herbicidas sintéticos.

× Pizzolato e Regehr (1978) detectaram que a maioria das dicotiledôneas é danificada pelo 2,4-DB (diclorofenoxibutírico), porque elas o degradam ao 2,4-D (diclorofenoxiacético), herbicidamente ativo, pela  $\beta$ -oxidação. Apesar do fato de que o 2,4-DB possa causar apreciável injúria nas leguminosas, elas possuem mecanismos de resistência ao herbicida. Os autores observaram modificações precoces da anatomia do internó de soja quando

pulverizada com o 2,4-DB. Foram observadas alterações no floema, nas regiões interfasciculares, e no metafloema condutor. Células do parênquima sofrem maior número de divisões periclinais, aumento de volume, divisão posterior em vários planos e, finalmente, hipertrofia. Outras modificações foram ainda observadas como quebra da epiderme, córtex diferenciado dependendo da sua localização e proliferação irregular do endoderma. Houve, ainda, modificação no parênquima do último metafloema e do floema secundário inicial.

Segundo Dionello e Basta (1984), substâncias alelopáticas, inibidoras de germinação e crescimento, podem causar mudanças na estrutura das paredes celulares. Isto seria análogo ao caso dos inibidores ou estimuladores de germinação, que podem atuar sobre a membrana celular, regular sua permeabilidade e dificultar ou estimular diferentes processos necessários à germinação. Dos testes realizados, a raiz foi o órgão mais afetado pelos inibidores de crescimento presentes nas espécies *Ageratum conyzoides*, *Crotalaria retusa*, *Phyllanthus niruri* e *Vinca rosea*. A descoberta de um inibidor de espectro limitado, que afete mais uma espécie de células mais do que outras, seria ideal. Tal especificidade de ação pode ser esperada entre as substâncias que afetam uma espécie de planta mais do que outra, raízes e não caules, folhas e não raízes, etc.

Segundo Ferri (1979), há inibidores de crescimento naturais de natureza fenólica. Um dos componentes do sorgoleone é o ácido fenólico (Lehle e Putnam, 1983), o que justifica a realização do presente estudo.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Para testar o efeito alelopático do sorgoleone (SGL) foi utilizada a variedade Carioca MG do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). O trabalho foi iniciado em janeiro de 94 e foi conduzido parte no Laboratório de Citologia e Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia/UFLA e parte em casa de vegetação da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG).

#### **3.1 Extração de sorgoleone**

Sementes de sorgo, variedade BR 601, foram colocadas para germinar semanalmente em placas de Petri com papel de filtro previamente esterilizados e umedecidos com água destilada. Cerca de 110 placas com uma média de 12 sementes por placa foram colocadas para germinar. Foram realizadas 20 extrações de SGL.

Após 7 (sete) dias da germinação foi utilizada uma solução de 20 ml de cloreto de metileno e 50 µl de ácido acético para a extração de SGL das raízes. Essas soluções foram colocadas num becker de 40 ml onde eram mergulhadas as raízes de sorgo por alguns segundos. Após algumas horas, essa solução evaporava-se e o SGL ficava depositado no fundo do becker, sendo então tampado com papel alumínio e conservado em geladeira até sua utilização.

### 3.2 Diluição do sorgoleone

A diluição do SGL foi feita em 1000 ml de solução nutritiva de Hoagland e Johanson (Pizzolato e Regehr, 1978) colocadas em beckeres separados e levados para um aquecedor-agitador, até a temperatura de 35°C.

Tubo de ensaio com 1 ml de água destilada foi colocado em banho-maria durante 15 minutos aproximadamente. Nesse tubo de ensaio, foi colocado o SGL previamente pesado, correspondendo a 1,5 molar = 53 µg.

Em seguida, esta solução foi submetida à agitação para facilitar a mistura. Foi utilizada também uma gota de metanol e cloreto de metileno para ajudar na diluição do SGL.

À solução de SGL obtida, foi adicionada a solução de Hoagland e Johanson para se obter os tratamentos de 0,01; 0,05; 0,10; 0,15 mM de SGL as quais foram utilizadas no experimento.

### 3.3 Aplicação dos tratamentos nas plântulas de feijão

Sementes de feijão foram colocadas para germinar em bandejas com vermiculita por um período de 7 (sete) dias em casa de vegetação. Após este período, as plântulas foram transferidas para frascos de vidro de 200 ml contendo solução de Hoagland e outros com a solução de Johanson. As plântulas permaneceram nestas soluções por um período de 24 horas para adaptação quando, então, foram transferidas para os frascos contendo as diferentes concentrações de SGL. Para cada tratamento foram utilizadas 4 plântulas.

Durante 7 (sete) dias, foi feita observação diária do aspecto das plântulas de feijão em desenvolvimento.

### **3.4 Método citogenético**

Nos 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dias após os tratamentos, as pontas de raízes das plântulas de feijão, com aproximadamente 5 mm de comprimento, foram coletadas, fixadas em Carnoy (álcool etílico e ácido acético glacial, 3:1) por 24 horas e estocadas em álcool 70% a 4°C até utilização. Após a hidrólise em ácido clorídrico 1N a 60°C foi realizada a coloração com Giemsa a 2% em tampão fosfato e as lâminas foram montadas com Entellan, de acordo com a metodologia proposta por Guerra (1983).

Foram observadas 500 células por lâmina, sendo 2.000 por tratamento por dia de coleta e 30.000 no total do experimento.

Foram analisados os seguintes aspectos da divisão celular e/ou cromossomas:

- índice mitótico (total de células: número de células em divisão x 100);
- ocorrência de metáfases colchicínicas;
- ocorrência de pontes, fragmentos, cromossomas atrasados e micronúcleos na anáfase e telófase;
- ocorrência de cromossomas pegajosos;

Para as fotomicrografias foi utilizado filme Fujicromo ASA 100 e fotomicroscópio de campo claro Carl Zeiss Jena.

### 3.5 Método Anatômico

Foram coletados os caules das plântulas de feijão no 7º dia após tratamento, os quais foram fixados e armazenados em álcool 70% até a confecção das lâminas. As avaliações foram realizadas em cortes transversais, feitos à mão livre e corados com vermelho congo diluído em água a 1% e verde iodo acético a 1%. As lâminas foram montadas com os cortes e água glicerinada, de acordo com a metodologia proposta por Dop e Gaudiê (1928).

A Figura 1 indica onde foi feito o corte a ser analisado na plântula de feijoeiro, testada no experimento.

### 3.6 Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com 4 repetições, com parcelas subdivididas no tempo. Os tratamentos das parcelas correspondem às doses de SGL e os da subparcelas, as épocas de coletas. Foi feita a análise de variância e regressão.

Modelo matemático :

$$Y_{ijk} = m + t_i + e_{ik} + d_j + e_{jk} + td_{ij} + e_{ijk}$$

$m$  : média geral do caráter;

$t_i$  : efeito de doses  $i$ ;  $i = 1, \dots, 5$ ;

$e_{ik}$  : efeito do erro experimental associado à parcela que recebeu a dose  $i$ , na repetição  $k$ ;

$d_j$  : efeito de dias de coleta  $j$ ;  $j = 1, \dots, 3$ ;

$e_{jk}$  : efeito do erro experimental associado à subparcela que o dia  $j$ , na repetição  $k$ ;

$td_{ij}$  = efeito da interação nível  $i$  de doses com o nível  $j$  de dias de coleta;

$e_{ijk}$  = efeito do erro experimental, associado a subparcela dose  $i$ , dia  $j$  e repetição  $k$ .



FIGURA 1. Plântula de feijoeiro com 14 dias. Seta indica a região onde foram realizados os cortes.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Germinação das sementes de sorgo e produção de sorgoleone**

Pode-se observar que a germinação do sorgo é influenciada por fatores como a temperatura e a quantidade de água. Quando o papel de filtro na placa de Petri ficava com excesso de água, as sementes de sorgo não germinavam ou, se isso acontecia, era muito lento. A temperatura por volta de 28°C foi ideal para a germinação do sorgo e produção do SGL. Várias vezes durante os meses frios (com temperatura aproximadamente 18°C) tentou-se extrair o SGL, não se obtendo sucesso. Esses resultados estão de acordo com o que foi observado na literatura (Hess, Ejeta e Butler, 1991 e Carsky, Singh e Ndikawa, 1994). Carsky, Singh e Ndikawa, (1994) verificaram que em 1991, um ano de muita chuva, a população de sorgo emergida foi muito pequena.

Netzly e Butler (1986), também referem-se ao calor como um fator importante no desenvolvimento do sorgo. Na época do frio, não só a germinação era retardada como também a produção de SGL era menor.

O sorgo com 7 (sete) dias após a germinação já apresentava suas raízes avermelhadas; momento em que era feita a extração do SGL.

A cada extração foram utilizadas em média 1320 raízes de sorgo. Quantidade relativamente pequena em relação ao total necessário, sendo portanto, realizadas várias extrações.

Netzly et al. (1988) verificaram que a quantidade exsudatos da raiz do sorgo variou de 1,5 a 2% em relação ao peso da raiz. Há pouco acúmulo de SGL nas raízes, sendo que menos de 10% pode ser recuperado dos exsudatos.

#### **4.2 Desenvolvimento das plântulas de feijoeiro**

Durante os 7 (sete) dias em que as plântulas de feijoeiro foram submetidas aos tratamentos, observações diárias foram feitas no sentido de verificar se o desenvolvimento estava ocorrendo normalmente. Nenhuma alteração foi percebida quanto ao crescimento das plântulas, aspecto do caule e não houve enrolamento e nem murchamento das folhas (Figura 2). No presente trabalho, as plântulas de feijoeiro não apresentaram sintomas visuais de fitotoxicidade durante o período teste.

O efeito do SGL sobre o desenvolvimento e várias espécies pode ser observado na Tabela 1. Verifica-se nesta tabela que o SGL pode não influenciar o desenvolvimento de uma planta como a soja, mas pode causar efeitos inibitórios ou estimulantes, dependendo da espécie.

No entanto, Souza e Souza (1991) e Einhellig e Souza (1992) relatam que o SGL apresenta efeitos não seletivos, atingindo gramíneas e plantas de folhas largas; sintomas fitotóxicos foram mais evidentes sobre plantas daninhas do que sobre espécies cultivadas.

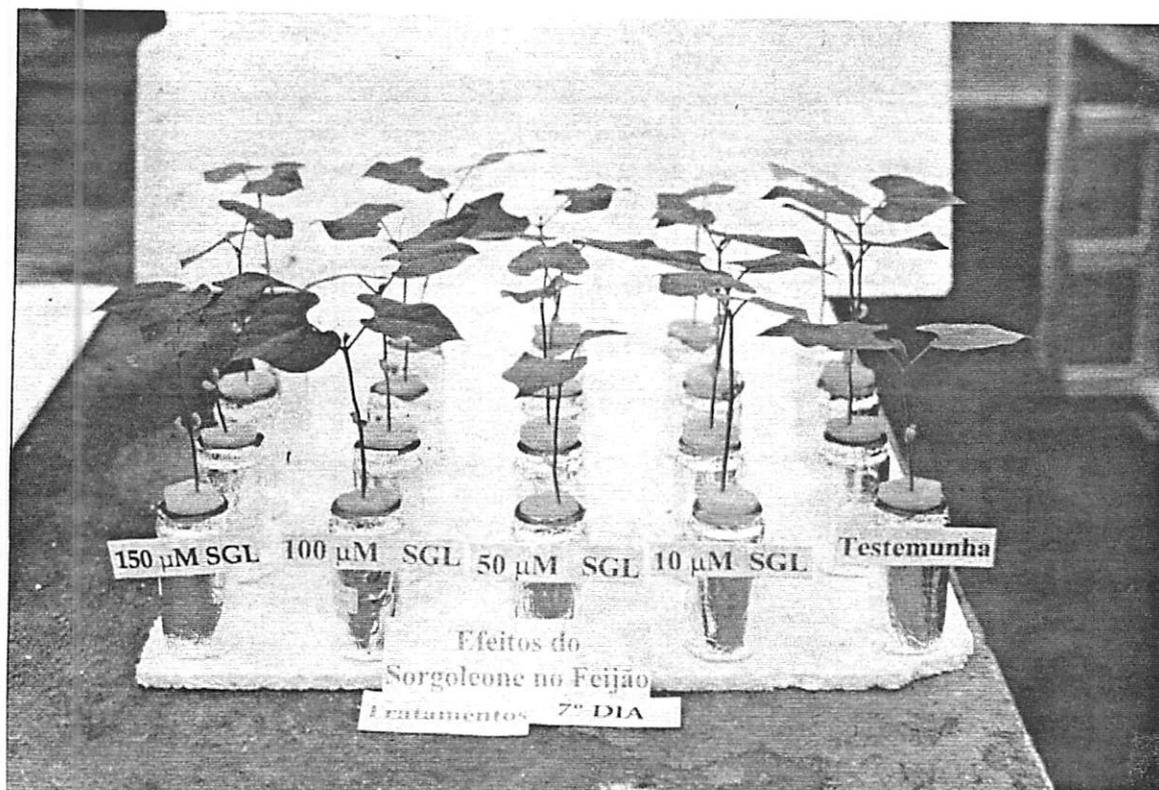


FIGURA 2. Plântulas de feijoeiro submetidas às diversas concentrações de SGL, no 7º dia de tratamento.

TABELA 1. O efeito do SGL sobre o desenvolvimento de várias espécies.

Espécie	Efeito SGL	Autor/ano
Trigo	inibiu 81% crescimento raiz, clorose das folhas, redução do crescimento e murchamento das plântulas	Guenzi, McCalla e Norstadt (1967)
Milho	inibiu 53% crescimento raiz	Guenzi, McCalla e Norstadt (1967) Einhellig e Rasmussen (1989)
Soja	não causa efeito	Einhellig e Rasmussen (1989) Souza e Souza (1991)
Alface	inibiu 85% crescimento raiz	Netzly e Butler (1986) Netzly et al. (1988)
Caruru	sintomas drásticos, morte da plântula	Souza e Souza (1991)
Lentilha d'água	inibe crescimento, inibe teor clorofila	Einhellig e Souza (1992)
Campanhinha chinesa	inibe crescimento	Einhellig e Souza (1992)
Setaria	inibe crescimento	Einhellig e Souza (1992)
Striga	estimula mas pode também inibir	Weearasuriirja et al. (1993).

### 4.3 Efeitos do sorgoleone sobre o ciclo celular

Embora não tenham sido observados efeitos visuais de fitotoxicidade no feijoeiro, durante o período de tratamento, a análise de 30.000 células do meristema apical das radículas demonstrou o efeito negativo do SGL.

Através da análise de variância e regressão observou-se que tanto as concentrações (doses) como os dias de coleta interferiram no ciclo celular. Com relação às doses aplicadas, os coeficientes de determinação foram significativos a nível de 1% para o índice mitótico ( $R^2 = 0,9080$ ) (Figura 3), bem como para os índices de interfase ( $R^2 = 0,8956$ ), de prófase ( $R^2 = 0,9193$ ) e de metáfase ( $R^2 = 0,1650$ ), sendo não significativo para anáfase em relação a testemunha (Figura 1A).

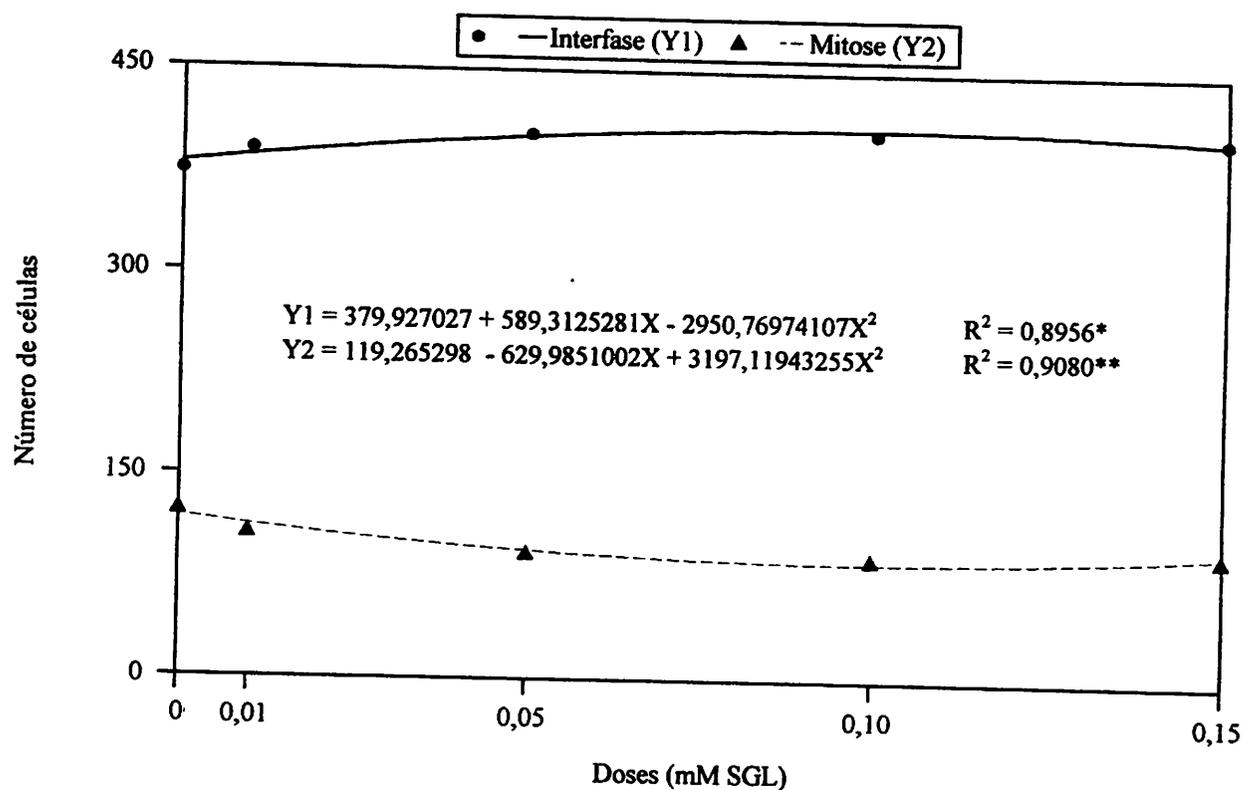


FIGURA 3. Efeito das doses de SGL sobre o índice mitótico do feijoeiro.

Quando se considerou os dias de coleta, a correlação foi significativa para todas as variáveis a nível de 1%, em comparação com a testemunha sendo encontrado os seguintes coeficientes de determinação para intérfase ( $R^2 = 0,9948$ ), prófase ( $R^2 = 0,9627$ ), metáfase ( $R^2 = 0,9987$ ) e anáfase ( $R^2 = 0,8204$ ). O material foi coletado no 3º, 5º e 7º dias de tratamento (Figura 2A e Figura 4).

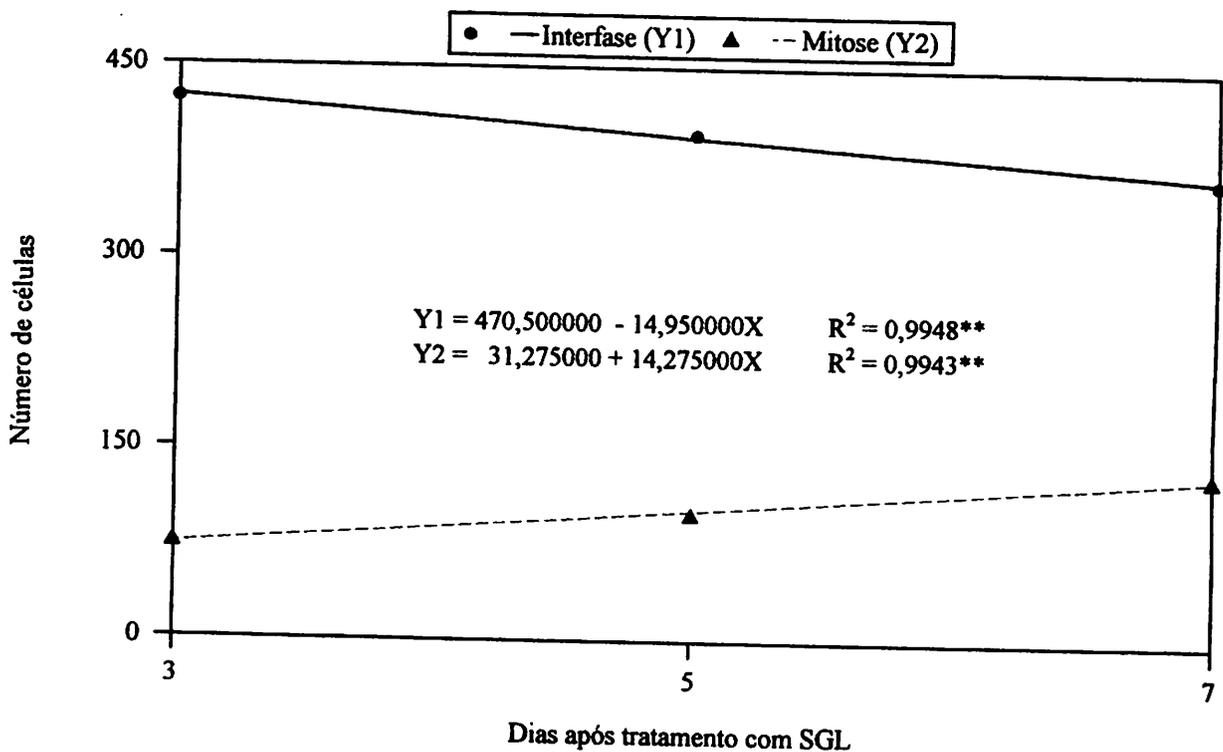


FIGURA 4 Efeito do tempo de tratamento do SGL sobre o índice mitótico do feijoeiro.

A telófase, última fase da mitose, não foi analisada porque o número de células que se encontravam nesta fase foi muito pequena (Tabela 2). Nesta tabela verifica-se que na primeira coleta (3º dia), todas as concentrações de SGL aplicadas levaram a um aumento na porcentagem de intérfase e diminuição das fases da mitose quando comparadas com a testemunha. A dose que mais afetou a divisão celular foi de 0,10 mM de SGL. Na segunda coleta

(5º dia, no entanto, a dose mais baixa (0,01 mM) foi a que mais afetou a divisão celular, ocorrendo um aumento gradual a partir da terceira dose sem, no entanto, se igualar à testemunha. A diminuição das células em divisão na terceira coleta (7º dia) acompanhou o aumento da dose. O menor índice mitótico nesta coleta (23,25%) foi maior que o das testemunhas da primeira e da segunda coleta (21,90% e 23,00%, respectivamente). Estes dados indicam, que, apesar do SGL ter afetado negativamente a divisão celular nas 3 coletas, no 7º dia as plântulas, tratadas e não tratadas, provavelmente deveriam estar mais adaptadas às condições do experimento.

TABELA 2. Índice mitótico e das fases da mitose (%), nas diversas concentrações de SGL e nos diferentes dias de coleta.

Concentrações de SGL (mM)	IMI	IP	IM	IA	IT*
<b>3º dia</b>					
0,00	21,90	18,30	24,50	1,00	0,15
0,01	17,40	16,50	0,70	0,20	0,00
0,05	12,25	11,25	0,70	0,30	0,00
0,10	10,80	9,35	1,10	0,35	0,00
0,15	13,25	11,05	1,45	0,65	0,10
<b>5º dia</b>					
0,00	23,00	20,00	1,80	0,95	0,25
0,01	17,55	13,95	2,25	1,10	0,25
0,05	18,20	12,05	3,95	2,00	0,20
0,10	21,40	16,85	2,60	1,50	0,45
0,15	21,60	16,75	3,15	1,35	0,35
<b>7º dia</b>					
0,00	30,25	21,75	6,45	1,95	0,10
0,01	30,45	25,00	3,35	1,70	0,40
0,05	27,30	21,10	3,65	1,55	1,00
0,10	24,15	19,55	2,80	1,30	0,50
0,15	23,25	18,95	3,00	0,95	0,35

IMI - índice mitótico

IP - índice prófase

IM - índice metáfase

IA - índice anáfase

Na Figura 5, fica claro o comportamento das fases da mitose em função dos dias de coleta e nas diversas concentrações.

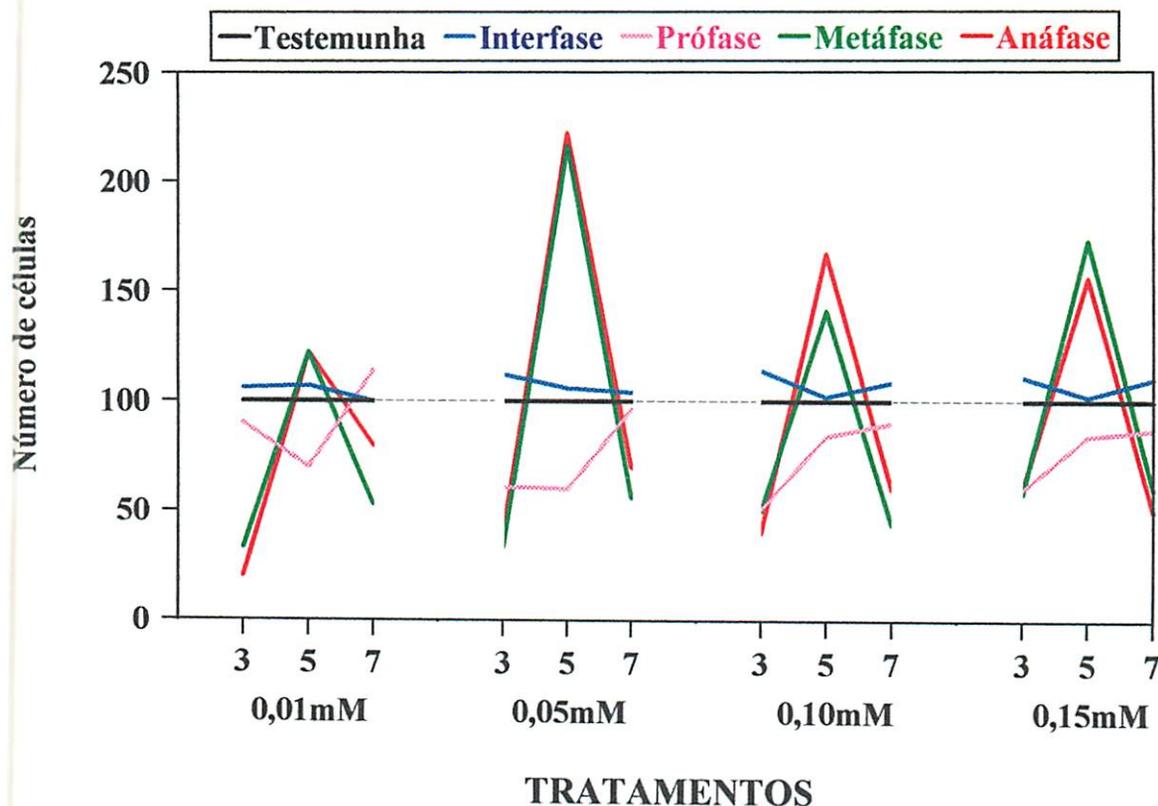


FIGURA 5. Efeito das doses e tempo de tratamento do SGL sobre o ciclo celular do feijoeiro.

O número total de células observadas em cada fase na testemunha foi considerada como 100 e correlacionada com o número de células observadas nos tratamentos.

A interfase foi sempre acima do valor da testemunha. Com o tratamento de 0,01 mM houve um pequeno aumento inicialmente no 3º dia até o 5º dia, sofrendo uma queda no 7º dia de tratamento. Com o tratamento de 0,05 mM no 3º dia o número estava maior em comparação com o tratamento de 0,01 mM, ocorrendo uma queda no 5º e 7º dia. Com o

tratamento de 0,10 mM no 3º dia o número foi mais elevado que o tratamento de 0,05 mM, houve uma queda no 5º dia e uma pequena elevação no 7º dia. Com o tratamento de 0,15 mM no 3º dia o número foi um pouco mais baixo que o tratamento 0,10 mM, houve queda no 5º dia e elevação no 7º dia, semelhante ao tratamento de 0,01 mM.

A prófase, na maioria da vezes, apresentou abaixo da testemunha. Com o tratamento de 0,01 mM houve uma queda do 3º para o 5º dia e depois uma elevação no 7º dia bem superior ao valor do 3º dia, e ultrapassando o valor da testemunha. Com o tratamento de 0,05 mM os valores do 3º e 5º dias foram os mesmos e inferiores à testemunha, elevando-se no 7º dia, mas manteve ainda inferior a testemunha.. Com o tratamento de 0,10 mM o valor do 3º dia foi baixo, elevando-se no 5º dia e ocorrendo mais uma elevação no 7º dia, permanecendo esse valor abaixo da testemunha. Com o tratamento de 0,15 mM, o aspecto foi semelhante ao tratamento de 0,10 mM, houve elevação do 3º para o 5º dia e do 5º para o 7º dia de tratamento.

Em todos os tratamentos a metáfase apresentou uma elevação brusca do 3º para o 5º dia e depois uma redução também brusca do 5º para o 7º dia. Com o tratamento de 0,01 mM, o valor inicial no 3º dia foi bem inferior a testemunha, elevando-se no 5º dia pouco acima de 100 e sofrendo queda no 7º dia. Com o tratamento de 0,05 mM do 3º para o 5º dia teve elevação brusca e uma queda também brusca do 5º para o 7º dias. Com o tratamento de 0,10 mM, houve uma elevação do 3º para o 5º dia e uma queda do 5º para o 7º dia, porém, menos brusca que a ocorrida com o tratamento de 0,05 mM. Com o tratamento de 0,15 mM, houve uma elevação do 3º para o 5º dia e uma queda do 5º para o 7º dia.

A anáfase juntamente com a metáfase, foi a fase que mais variou e atingiu os valores mais altos que aqueles apresentados nas outras fases. Com o tratamento de 0,01 mM o índice ficou quase que paralelo a metáfase, houve uma elevação do 3º para o 5º dia e depois uma

queda no 7º dia. Com o tratamento de 0,05 mM foi o que iniciou com o menor número no 3º dia e no 5º dia, havia atingido o pico mais alto de todos os tratamentos e em todos os dias. Do 5º para o 7º dia houve também uma queda brusca. Sua variação foi semelhante à metáfase. Com o tratamento de 0,10 mM, houve elevação do 3º para o 5º dia e uma queda do 5º para o 7º dia. Foi superior à metáfase. Com o tratamento de 0,15 mM, houve elevação do 3º para o 5º dia e uma queda do 5º para o 7º dia, sendo também superior à metáfase.

Além de diminuir o número de células em divisão o SGL levou a formação de metáfases colchicínicas (Tabela 3 e Figura 6), pontes e cromossomas atrasados em anáfases e telófases (Figura 7) e núcleos poliplóides.

TABELA 3. Média de células em metáfase no 3º, 5º e 7º dias de tratamento com SGL e % de metáfases colchicínicas (MC).

Concentrações de SGL (mM)	3º dia		5º dia		7º dia	
	Metáfase	% MC	Metáfase	% MC	Metáfase	% MC
0,00	12,25	0,0	9,0	0,0	32,0	0,0
0,01	3,50	0,0	10,0	12,5	11,0	34,3*
0,05	3,50	0,0	14,0	41,0*	12,5	31,5
0,10	5,00	9,0	11,0	18,2	11,25	19,6
0,15	4,50	37,9*	12,5	26,0	14,0	6,6

Através da análise estatística, verificou-se a ocorrência de um número significativo de metáfases colchicínicas na maioria dos tratamentos, com exceção das concentrações de 0,01 e 0,05 mM do 3º dia; todas as outras induziram a formação de metáfases colchicínicas.

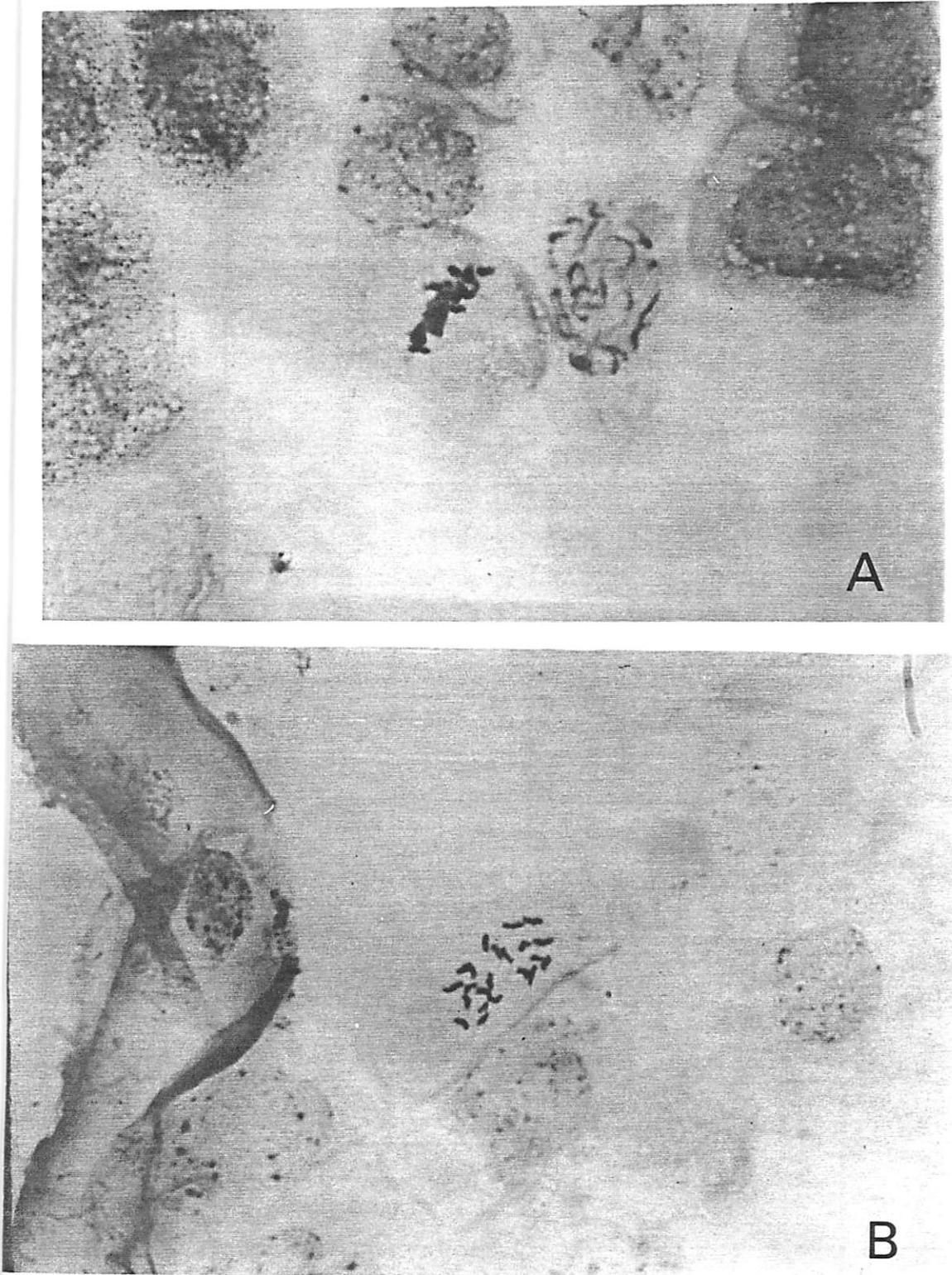


FIGURA 6. Metáfases mitóticas do feijoeiro: metáfase normal (A) e metáfase colchicínica (B).

Aumento total: 1.700X.

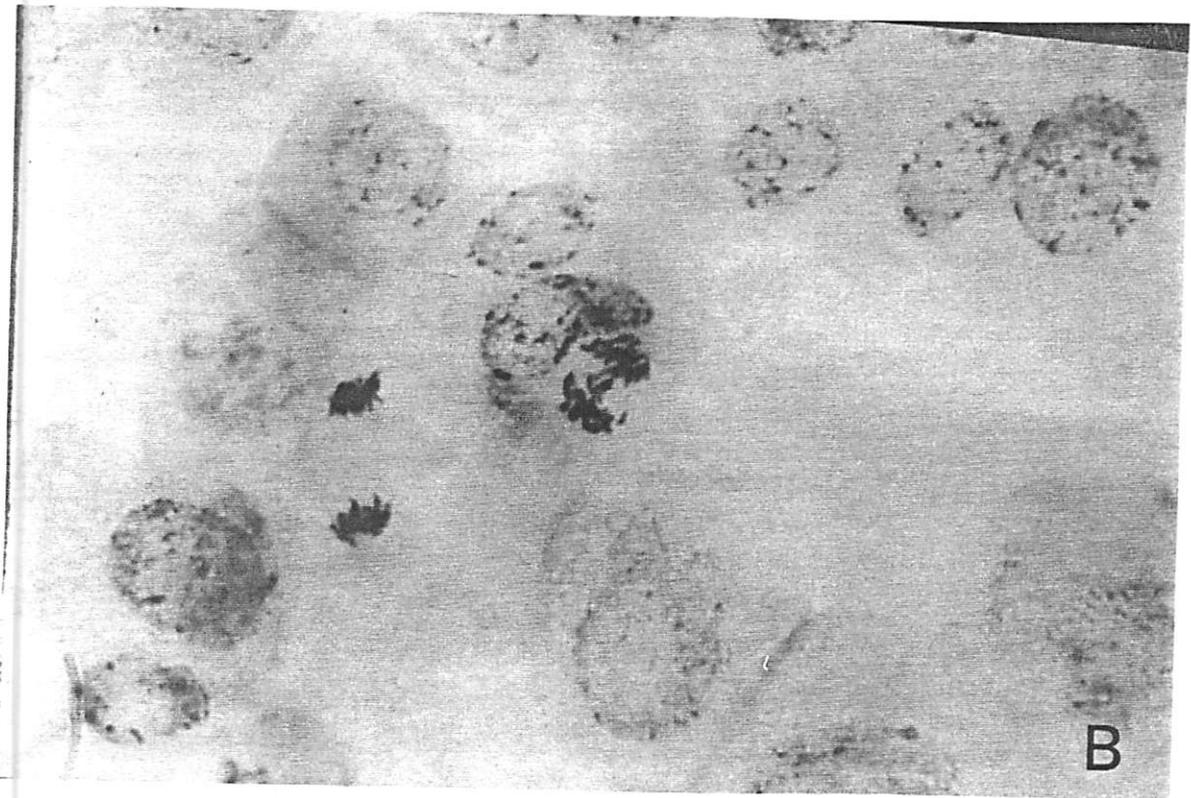
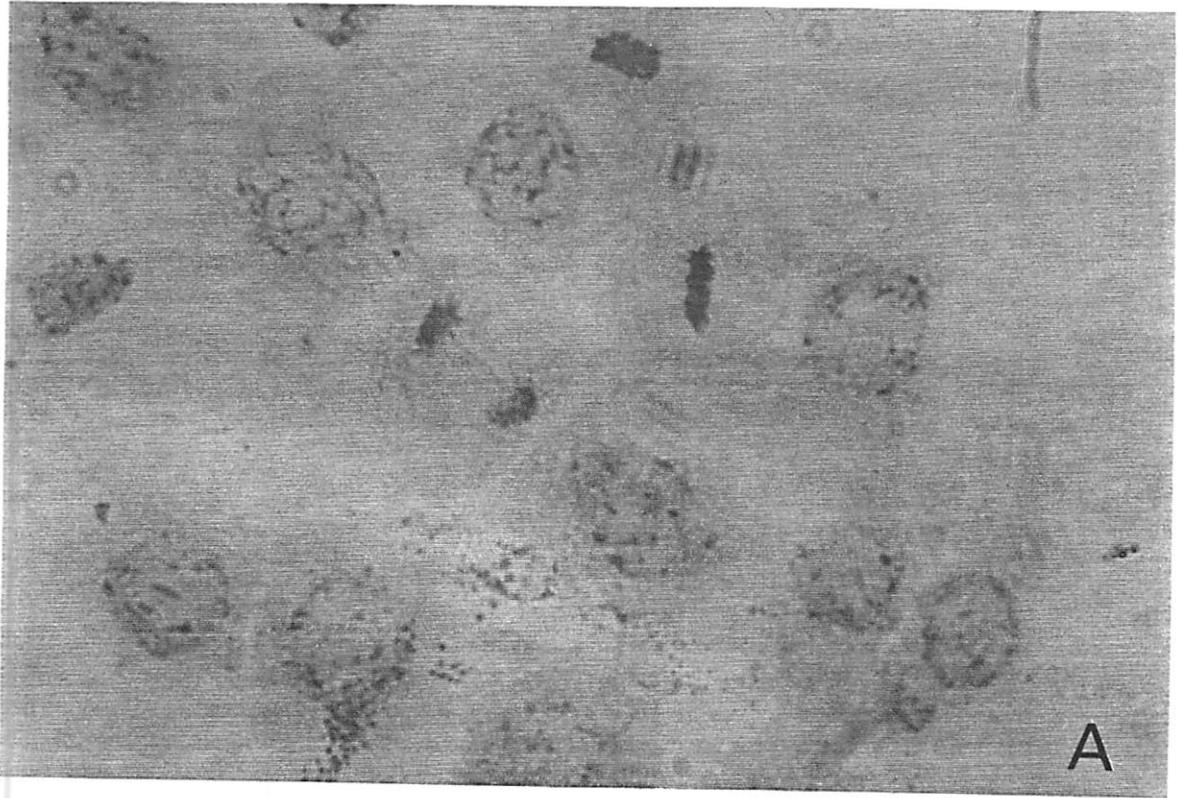


FIGURA 7. Anomalias do ciclo celular do feijoeiro tratado com SGL. (A) telófase com ponte e (B) anáfase com cromossoma atrasado. Aumento total: 1.700X.

No 5º dia o maior índice foi no tratamento de 0,05 mM e no 7º dia, houve uma inversão e, a maior porcentagem de células em metáfase colchicínica foi observada no menor tratamento (0,01 mM). Isso leva a pensar que quanto maior o tempo do tratamento, uma menor dose é capaz de causar efeito.

A denominação metáfase colchicínica é utilizada para indicar aquelas metáfases que apresentam os cromossomas espalhados como ocorre quando se emprega um inibidor mitótico, como a colchicina. Esse alcalóide, despolimeriza as proteínas microtubulares impedindo a formação das fibras do fuso de divisão. Desta forma, não ocorre a segregação dos cromossomas na anáfase e a célula volta para a intérfase sem que a divisão se complete. Como já havia ocorrido duplicação do DNA na intérfase anterior, a célula torna-se poliplóide (Figura 8). No caso do feijoeiro, cujo número somático de cromossomas é  $2n = 2x = 22$ , foram encontrados núcleos com  $2n = 4x = 44$  cromossomas, o que vem reforçar a hipótese do inibidor sobre o ciclo celular para o SGL.

O efeito do SGL sobre os cromossomas foi detectado através da observação de cromossomas atrasados, pontes e fragmentos nas anáfase e telófase.

As pontes e cromossomas atrasados foram observados na concentração 0,05 mM, no 5º dia de tratamento e nas concentrações de 0,01; 0,05 e 0,10 mM do 7º dia. A ocorrência de pontes indica que o SGL pode estar provocando quebras nos cromossomas, os quais unem-se, ficando com dois centrômeros. No momento da segregação, na anáfase, quando os centrômeros de um mesmo cromossoma vão para polos opostos, é possível visualizá-las. Isto leva a um ciclo, denominado por McClintocks (1942) de "ciclo quebra-fusão-ponte". Normalmente, acompanhando essas pontes, existem fragmentos de cromossomas acêntricos, os quais são perdidos durante a divisão celular, levando a formação de células com núcleos deficientes.

Provavelmente essas alterações seriam mais frequentes se o período de coleta fosse mais prolongado.

A ocorrência de cromossomas atrasados pode ser devida à má formação das fibras cinetocórias do fuso de divisão, fazendo com que esses cromossomas não sejam puxados para os polos. O aumento na viscosidade dos cromossomas, tornando-os pegajosos, também, pode levar ao atraso dos mesmos.

As anomalias encontradas neste trabalho não foram observadas nas plantas testemunhas. Pode-se considerar, portanto, que o feijoeiro apesar de apresentar cromossomas pequenos, constitui um bom sistema para a avaliação do efeito de substâncias sobre o ciclo celular e os cromossomas.

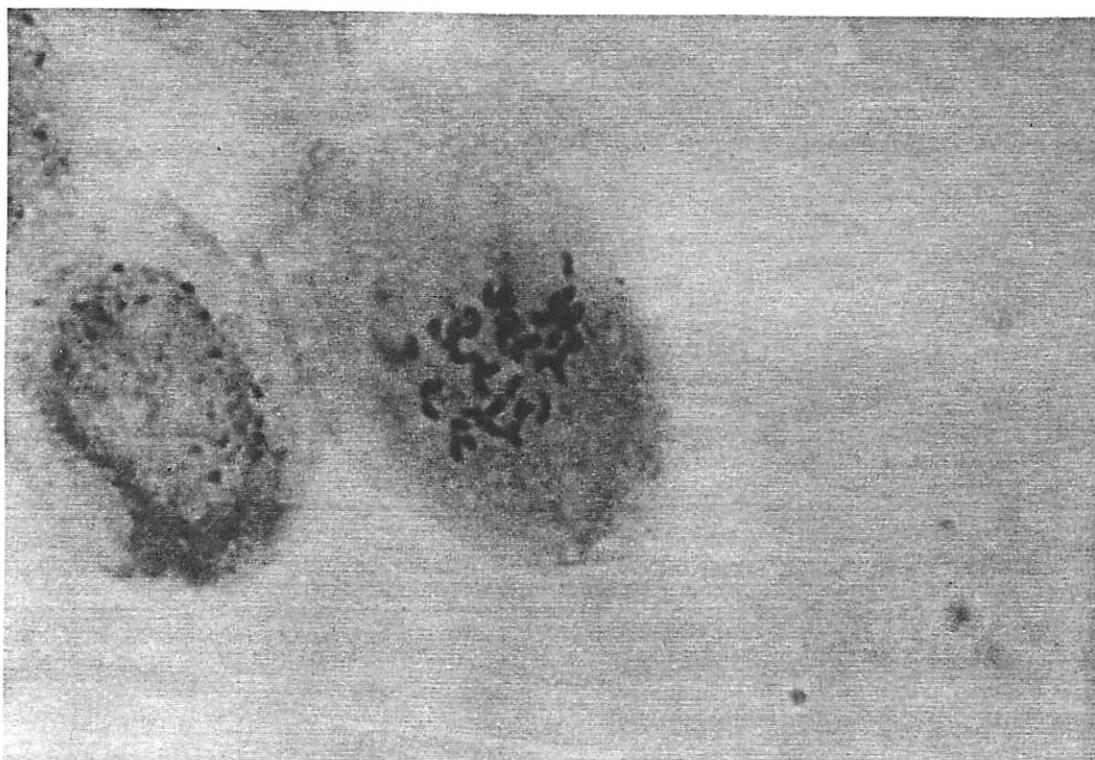


FIGURA 8. Célula poliplóide. Aumento total: 1.700X.

#### 4.4 Análise anatômica do caule do feijoeiro

##### 4.4.1 Descrição do corte transversal do caule de feijoeiro

As Figuras 9 e 10 apresentam os aspectos do corte transversal do caule do feijoeiro.

Algumas das características analisadas na testemunha, encontram-se a seguir:

**Epiderme:** unisseriada; parede periclinal externa das células epidérmicas espessa e convexa; cutícula delgada, estriada, presença de estômatos e tricomas (simples e pluricelulares). Estômatos em posição mais elevada em relação às células epidérmicas comuns.

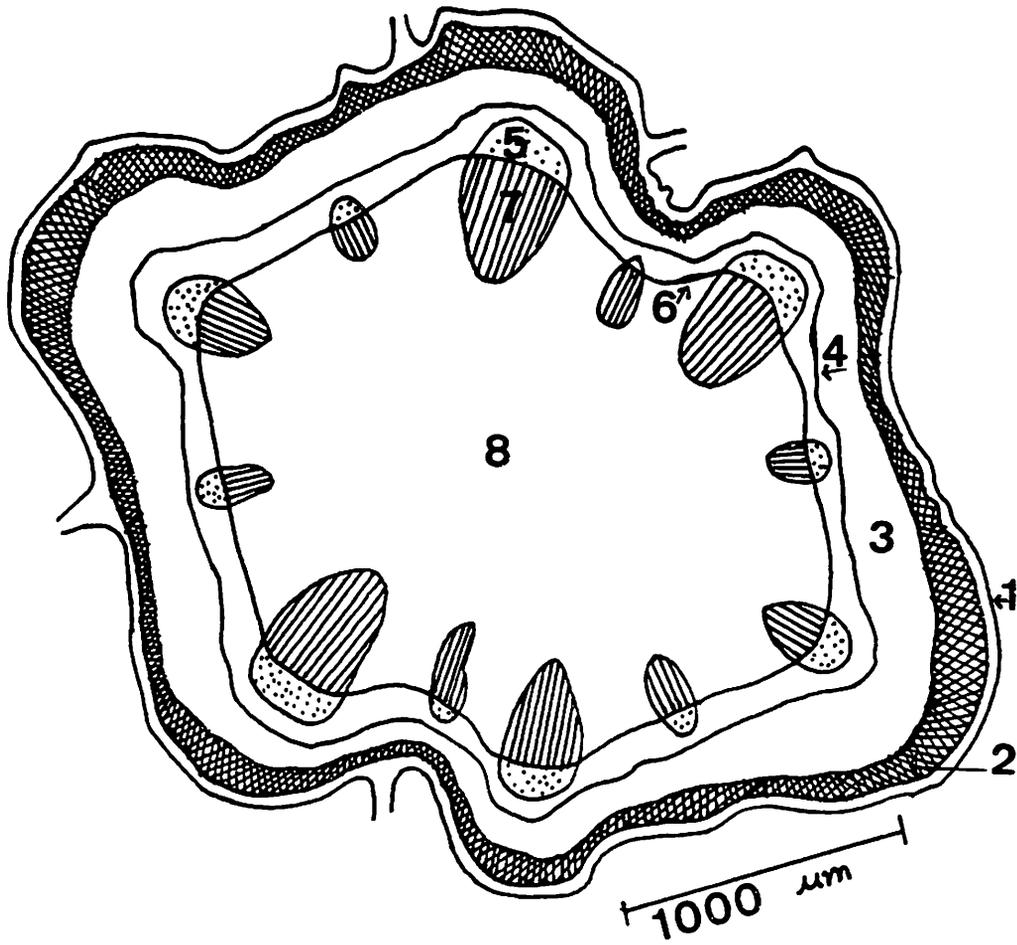
**Colênquima:** do tipo angular-lacunoso, ocorre em todo o contorno do caule; nas porções angulosas pode ser constituído por 3-4 camadas celulares, e no restante é formado por uma camada.

**Parênquima cortical:** formado por 3-4, raramente 5 camadas celulares, que pode ser caracterizado como um colênquima, devido a presença de cloroplastídeos.

**Bainha amilífera:** estrutura de reserva de amido, apresentou-se contínua em toda a extensão do corte.

**Feixes vasculares:** colaterais, porção floemática e xilemática separadas por câmbio fascicular. Na região onde foi feito o corte já se instalou um câmbio típico, já havendo a formação de novos feixes vasculares entre aqueles de maior tamanho e que correspondem as regiões angulosas do caule. Externamente ao floema, em contato com a bainha amilífera, ocorre a presença de fibras.

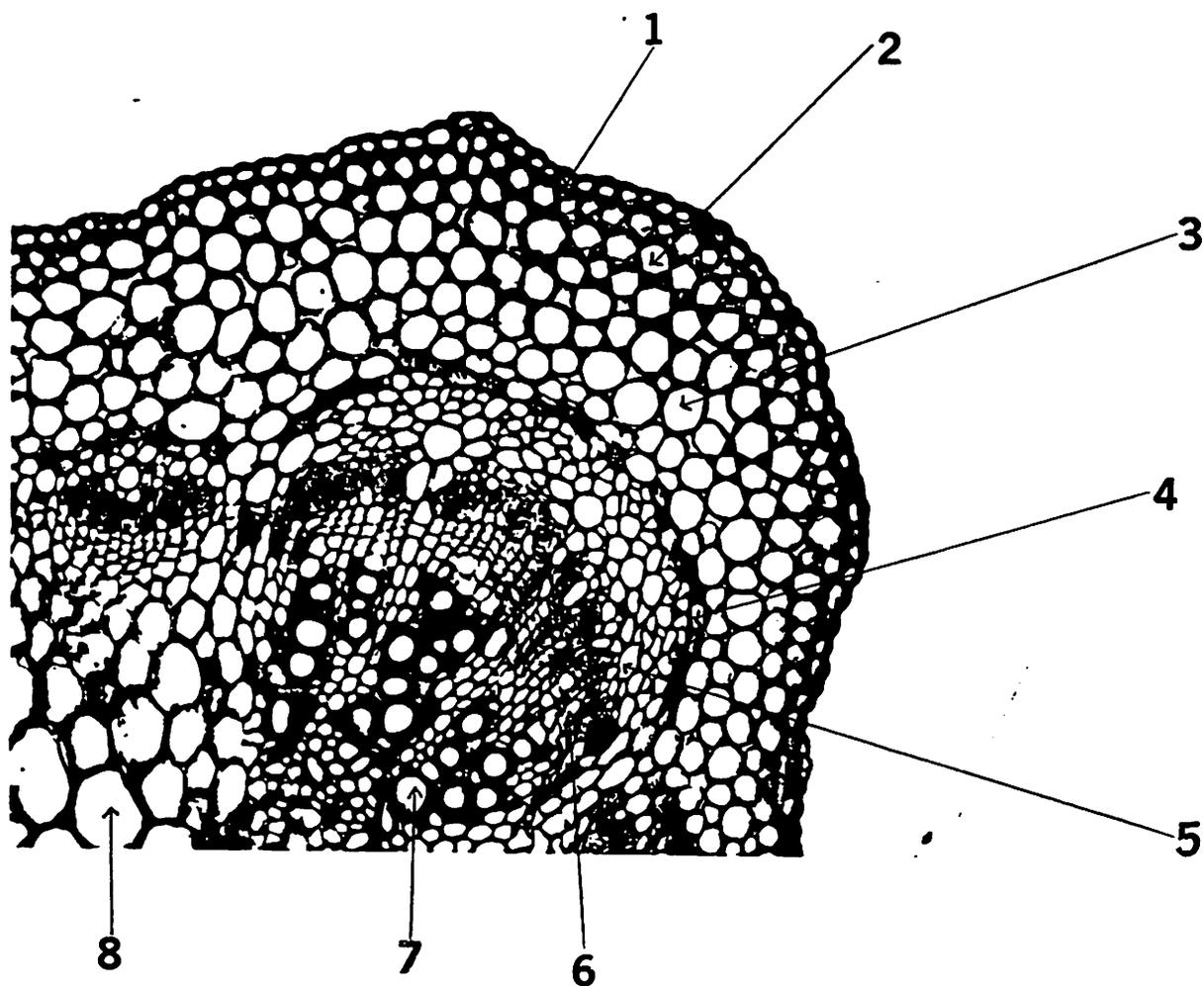
**Parênquima medular:** típico, células com grãos de amido.



**LEGENDA:**

- 1 Epiderme
- 2 Colênquima
- 3 Parênquima Cortical
- 4 Bainha amilífera
- 5 Floema
- 6 Faixa Cambial
- 7 Xilema
- 8 Parênquima medular

**FIGURA 9.** Esquema do corte transversal do caule de feijoeiro. Reduzido 40%.



**LEGENDA:**

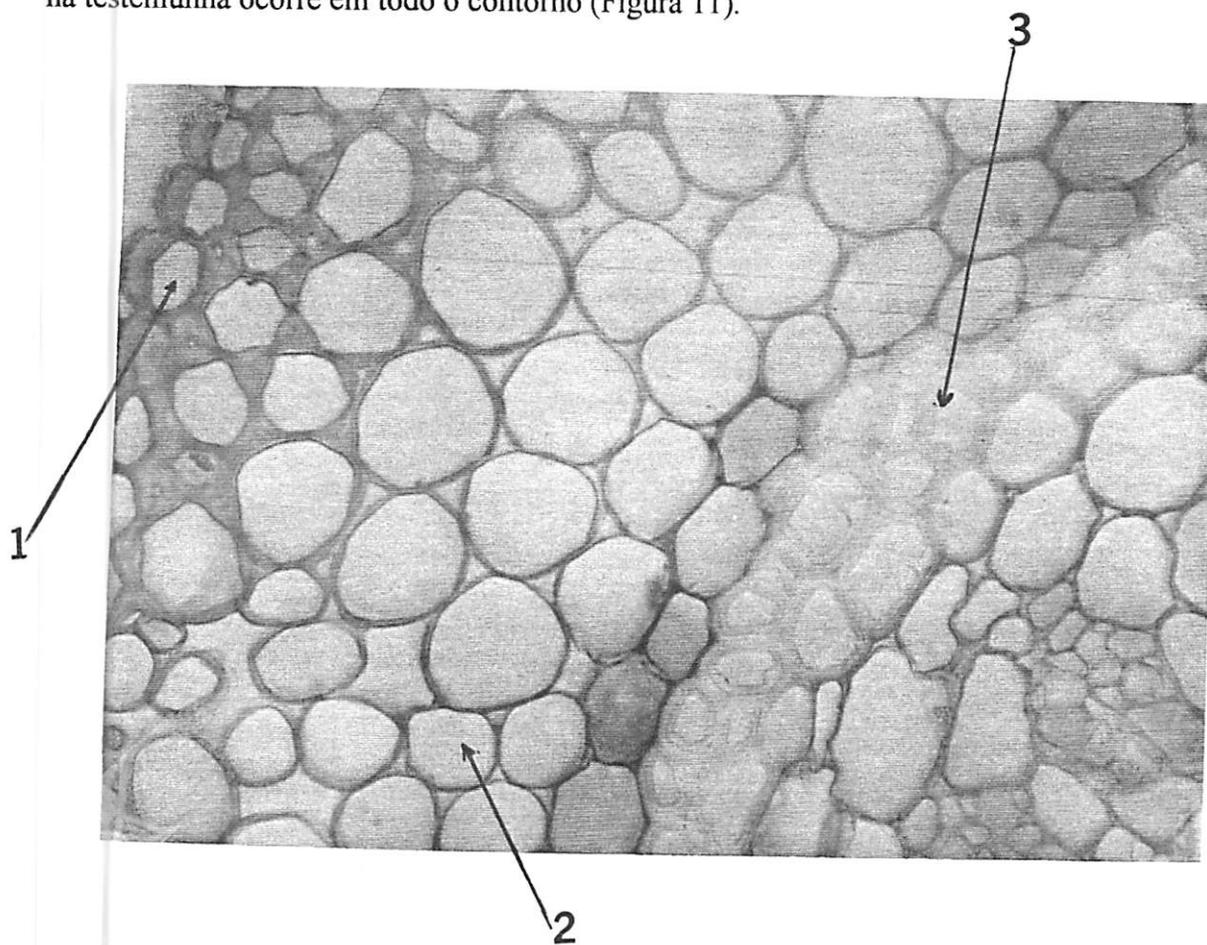
- 1 Epiderme
- 2 Colênquima
- 3 Parênquima Cortical
- 4 Bainha amilífera
- 5 Floema
- 6 Faixa Cambial
- 7 Xilema
- 8 Parênquima medular

FIGURA 10. Corte transversal do caule do feijoeiro com 14 dias (testemunha). Aumento total: 1.700X.

Comparando essas estruturas observadas na testemunha, nos tratamentos de 0,01 e 0,05 mM de SGL, nenhuma alteração foi evidenciada.

Nos tratamentos de 0,10 e 0,15 mM de SGL, pequenas alterações ocorreram.

O colênquima apresentou-se com menor número de camadas nos ângulos, 1 a 2 camadas celulares comparadas com 3-4 da testemunha; nas regiões intermediárias o espessamento foi quase que restrito à porção da parede em contato com a epiderme enquanto que na testemunha ocorre em todo o contorno (Figura 11).



LEGENDA:

- 1 poucas camadas celulares no colênquima
- 2 maior número de camadas no parênquima
- 3 floema rico em fibras

FIGURA 11. Corte transversal do caule do feijoeiro. Aumento total: 680X.

No parênquima cortical foi observado maior número de camadas celulares. Este aumento, provavelmente tenha ocorrido em virtude da diminuição das camadas de colênquima (Figura 11).

Quanto a bainha amilífera, essa apresentou-se evidentemente descontínua nas regiões situadas entre os feixes de maior porte (Figura 12).

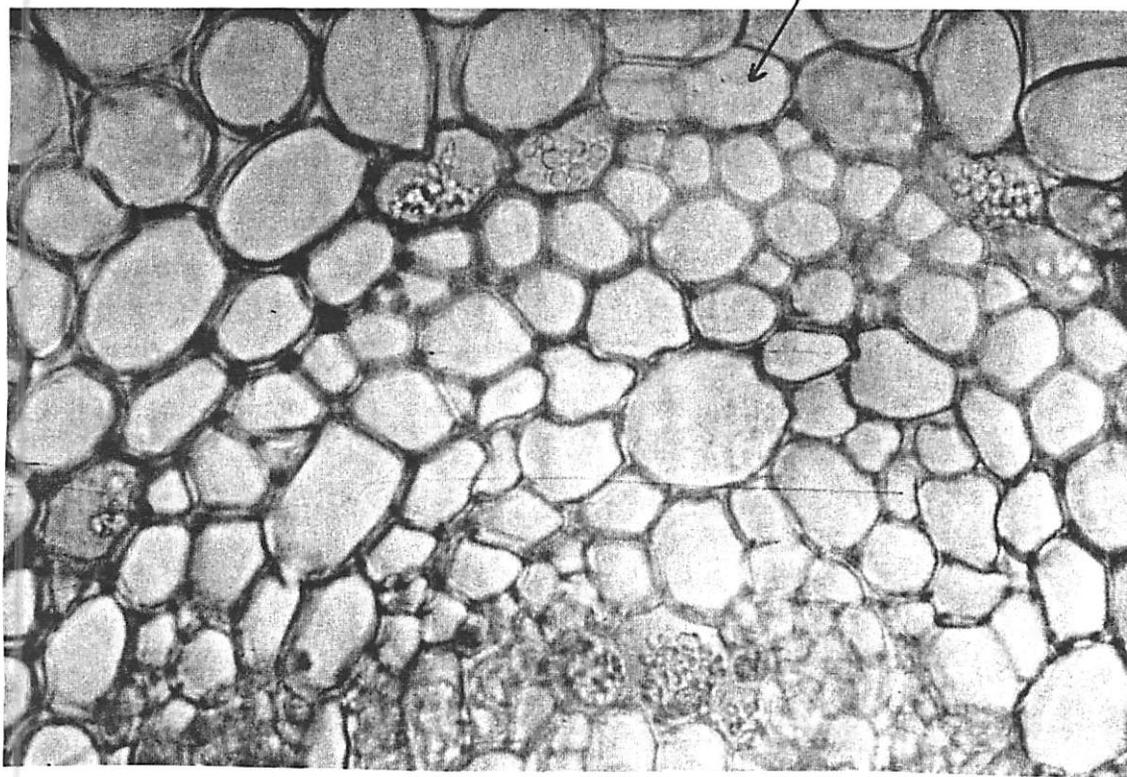


FIGURA 12. Corte transversal do caule do feijoeiro com bainha amilífera descontínua. Aumento total: 680X.

O feixe vascular apresentou xilema com menor número de elementos de vaso lenhoso e formação de vasos deformados (ao invés de mais ou menos arredondados, estão alongados no sentido radial). No tratamento de 0,15 mM de SGL, essa alteração foi ainda mais evidente, com maior número de vasos deformados (Figura 13). No floema observou-se a presença de fibras em maior número de camadas extra-xilemáticas na porção externa do floema, imediatamente abaixo da bainha amilífera (Figura 11).

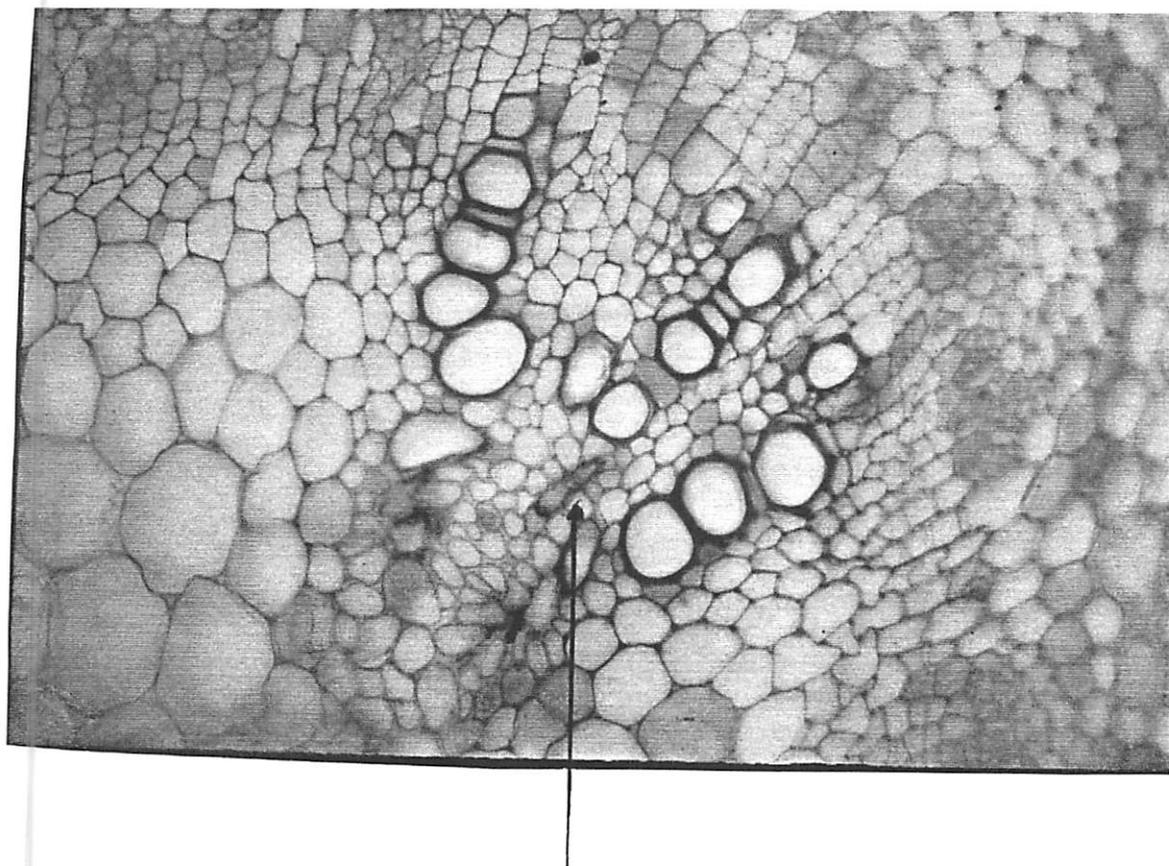


FIGURA 13. Corte transversal do caule do feijoeiro com xilema em forma alongada. Aumento total: 680X.

#### 4.5 Efeito do sorgoleone sobre o feijão

As alterações ocorridas na divisão celular e no caule do feijoeiro tratado com SGL provavelmente se devam à presença do ácido fenólico um dos compostos do sorgoleone.

Os fenoxiácidos, de acordo com Deuber (1992), podem inibir a divisão celular ou estimulá-la dependendo da dose aplicada e da parte da planta em que se encontra. O efeito inibitório pode ser direto, quando afeta, por exemplo, os microtúbulos, impedindo assim a segregação cromossômica e interferindo na formação da parede celular. Outras vezes, podem atuar indiretamente sobre a divisão celular, afetando a síntese de ácidos nucléicos (Deuber, 1992).

Os resultados desse trabalho parecem indicar que houve efeito sobre os microtúbulos, uma vez que devem ter impedido a formação das fibras do fuso de divisão (metáfases colchicínicas e núcleos poliplóides) e, levado à uma má orientação dos microtúbulos durante a formação da parede celular (células mais alongadas do xilema).

O fato do aparecimento de células apresentando cromossomas atrasados e pontes na anáfase principalmente na última coleta mostra o efeito do tempo sobre os cromossomas. Provavelmente essas alterações fossem mais frequentes se o período de coleta fosse mais prolongado.

Com esses resultados, podemos dizer que o potencial alelopático do sorgo (sorgoleone) interferiu no feijoeiro e salienta que, tornar-se necessário, cada vez mais buscar técnicas que permitam estudos mais complexos, capazes de avaliar os efeitos de substâncias em outras plantas, os quais nem sempre se manifestam através do aspecto físico da plântula e num curto período de teste.

Entendemos que o trabalho deveria prosseguir através de avaliações no campo e da avaliação do efeito do SGL sobre fertilidade. O emprego desse tipo de estudo em plantas suscetíveis poderia auxiliar na compreensão do efeito do SGL sobre a divisão celular e formação dos tecidos.

## **5 CONCLUSÕES**

O SGL atuou despolimerizando os microtúbulos que formam o fuso de divisão induzindo uma diminuição no índice mitótico e a ocorrência de metáfases colchicínicas e poliploidia.

Com maior tempo de tratamento, o SGL induziu quebras cromossômicas que levaram à formação de pontes e fragmentos em anáfases e telófases.

O SGL induziu alterações a nível de colênquima, parênquima, bainha amilífera e feixes vasculares. O efeito sobre os microtúbulos levou ao aparecimento de células alongadas no xilema.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F.S. **A alelopatia e as plantas**. Paraná, 1988. 66p. (Circular, 53)
- ALMEIDA, F.S. A defesa das plantas: Alelopatia. **Ciência Hoje**, São Paulo, v.11, n.62, p.40-46, mar. 1990.
- ALMEIDA, F.S. Efeitos alelopáticos de resíduos vegetais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.2, p.221-236, fev. 1991.
- ANTUNES, L.M.G. ; TAKAHASHI, C.S. Cytogenetic effects of mebendazole on in vivo and in vitro mammalian systems. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.17, n.3, p.273-276, 1994.
- BREAZEALE, J.F. The injurious after-effects of sorghum. **Journal of the American Society of Agronomy**, Madison, v.16, p.689-700, 1924.
- CAI, T.; BABIKER, A.G.; EJETA, G.; BUTLER, R.G. Morphological response of witchweed (*Striga asiatica*) to in vitro culture. **Journal of Experimental Botany**, London, v.44, n.265, p.1377-1384, Aug. 1993.
- CARSKY, R.J.; SINGH, R.; NDIKAWA, R. Suppression of *Striga hermonthica* on sorghum using a cowpea intercrop. **Experimental Agricultural**, New York, v.30, p.349-358, 1994.
- CARVALHO, S.I. **Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var. *Vulgaris* e cv. *Bandeirantes***. Viçosa: UFV, 1993. 72p. (Tese-Mestrado em Zootecnia).
- CECHIN; PRESS, M.C. The influence of nitrogen on growth and photosynthesis of sorghum infected with *Striga hermonthica* from different provenances. **Weed Research**, Oxford, v.34, p.289-298, Aug. 1994.

- CHANG, M.; NETZLY, D.H.; BUTLER, R.G.; RYNN, D.G. Chemical regulation of distance: Characterization of the first natural host germination stimulant for *Striga asiatica*. **Journal of the American Chemistry Society**, Washington, n.108, p.7858-7860, 1986.
- CHOU, C.H.; PATRICK, Z.A. Identification and phytotoxic activity of compounds produced during decomposition of corn and rye residues in soil. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.2, p.369-387, 1976.
- COOK, C.E.; WHICHARD, L.P.; TURNER, B.; WALL, M.E.; EGLEY, G.H. Germination of witchweed (*Striga asiatica* Lour): isolation and properties of a potential stimulant. **Science**, Washington, n.154, p.1189-1190, 1966.
- COOK, C.E. ; WHICHARD, L.P.; WALL, M.E.; EGLEY, G.H.; COGGAN, P.; LUHAN, P.A.; Mc PHAIL, A.T. Germination stimulants II . The structure of strigol a potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga asiatica* Lour). **Journal of the American Chemistry Society**, Washington, n.94, p. 6198-6199, 1972.
- DEUBER, R. **Ciência das plantas daninhas: Fundamentos**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 432p.
- DIAS , F.L.; TAKAHASHI, C.S. Cytogenetic evaluation of the effects of aqueous extracts of the medicinal plants *Alpinia nutans* Rosc (Zingiberaceae) and *Pogostemon heyneanus* Benth (Labiatae) on wistar rats and *Allium cepa* Linn (Liliaceae) root tip cells. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.17, n.2, p.175-180, 1994.
- DIONELLO-BASTA, S.B.; BASTA, F. Inibidores de germinação e de crescimento em plantas usadas na medicina popular. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.36, n.9, p.1602-1606, 1984.
- DOP, P.; GAUTIÉ, A. **Manual de technique botanique**. Paris: J. Lamarre, 1928. 594p.
- DURIGAN, J.C. ; ALMEIDA, F.S. **Noções sobre a alelopatia**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 28p.
- EGLEY, G.H. ; DALE, J.E. Ethylene, 2 chloroethyl-phosphonic acid and witchweed germination. **Weed Science**, New York, v.18, p. 586-589, 1970.
- EINHELLIG, F.A.; RASMUSSEN, J.A. Prior cropping with grain sorghum inhibits weeds. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.15, n.3, p.951-960, 1989.
- EINHELLIG, F.A.; SOUZA, I.F. Phytotoxicity of sorgoleone found in grain sorghum root exudates. **Journal of Chemical Ecology**, Dakota, v.18, n.1, p.1-11, 1992.

- EINHELLIG, F.A.; RASMUSSEN, J.A.; HEJL, A.M.; SOUZA, I.F. Effects of root exudate sorgoleone on photosynthesis. *Journal of Chemical Ecology*, Dakota, v.19, n.2, p.369-375, 1993.
- FERRI, M.G. *Fisiologia Vegetal*. São Paulo: EPU - Ed. da Universidade de São Paulo, 1979. 392p.
- GUENZI, W.D.; McCALLA, T.M.; NORSTADT, F.A. Presence and persistence of phytotoxic substances in wheat, oat, corn and sorghum residues. *Agronomy Journal*, Madison, v.59, p.163-164, Mar./Apr. 1967.
- GUERRA, M.S. O uso de Giemsa na citogenética vegetal: comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.37, n.2, p.190-193, 1983.
- HAUCK, C.; MULLER, S.; SCHILDKNECHT, H.A. A germination stimulant for parasitic flowering plants from *Sorghum bicolor*, a germinant host plant. *Journal Plant Physiological*, v. 139, p.474-478, 1992.
- HESS, D.E.; EJETA, G.; BUTLER, L.G. Research into germination of striga seed by sorghum root exudates. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PARASITIC WEEDS, 5, Nairobi, 1991. Fifth ... Nairobi: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1991. p.217-222.
- HSIAO, A.I.; WORSHAM, A.D.; MORELAND, D.E. Effects of sodium hypochlorite and certain plant growth regulators on germination of witchweed (*Striga asiatica*) seeds. *Weed Science*, New York, v. 29, p. 98-100, 1981.
- KURINNYI, A.I. Indication of environmental pollution by mutagenic pesticides from their gametocidal effect on plants. *Tsitologiya i Genetika*, Naukova Dumka, UL, v.17, n.4, p.32-35, 1983.
- LEHLE, F.R.; PUTNAM, A.R. Allelopathic potential of sorghum (*S. bicolor*): isolation of seed germination inhibitors. *Journal of Chemical Ecology*, New York, v.9, p.1223-1234, 1983.
- McCLINTOCK, B. The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. *Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America*, Washington, v.28, p.458-463, 1942
- MEDEIROS, A.R. *Determinação de potencialidades alelopáticas em agroecossistemas*. Piracicaba: ESALQ/USP, 1989. 92p. (Tese-Doutorado em Agronomia).

- NETZLY, D.H.; BUTLER, L.G. Root of sorghum exude hydrophobic droplets containing biologically active components. *Crop Science*, Madison, v.26, p.775-778, July/Aug. 1986.
- NETZLY, D.H.; RIOPEL, J.R.; EJETA, G.; BUTLER, R.G. Germination stimulants of witchweed (*Striga asiatica*) from hydrophobic root exudate of sorghum. (*Sorghum bicolor*). *Weed Science*, New York, v.36, p.441-446, 1988.
- OLIVIER, A.; BENHAMOU, N.; LEROUX, G.H. Mecanismos of resistance to *Striga hemonthica* in sorghum (*Sorghum bicolor*). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PARASITIC WEEDS, 5, Nairobi, 1991. Fifth ... Nairobi: The International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1991. p.127-136.
- PANASIUK, O.; BILLS, D.D.; LEATHER, G.R. Allelopathic influence of *Sorghum bicolor* on weeds during germination and early development of seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, New York, v.12, p.1553-1543, 1986.
- PATRICK, Z.A. Alelopathic mechanisms and their exploitation for biological control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Guelph, v.8, p.225-228, 1986.
- PILINSKAYA, M.A.; STEPANOVA, L.S. Effect of biotransformation of the insecticide furadan on its cytogenetic activity in vivo an in vitro. *Tsitologiya i Genetika*, Naukova Dumka, UL, v.18, n.1, p.17-20, 1984.
- PIZZOLATO, T.D.; REGEHR, D.L. Early modifications of the intermodal anatomy of Glycine maz sprayed with 2,4-DB. *Canadian Journal Botany*, Ottawa, v.57, p.1340-1344, 1978.
- PUTNAM, A.R.; DUKE, W.B. Allelopathy in agroecosystems. *Annual Review Phytopathology*, Palo Alto, n. 16, p.431-451, 1978.
- PUTNAM, A.R.; DE FRANK, J. Use of phytotoxic plant residues for selective weed control. *Crop Protection*, Surrey, v. 2, p.173-181, 1983.
- RASMUSSEN, J.A.; HEJL, A.M.; EINHELLIG, F.A.; THOMAS, J.A. Sorgoleone from root exudate inhibits mitochondrial functions. *Journal of Chemical Ecology*, Dakota, v.18, n.2, p.197-207, 1992.
- RICE, E.L. *Allelopathy*. 2.ed. Orlando: Academic Press, 1984. 422p.
- SAMPERIZ, M.M.F.; BLUMEN, G. Efeitos da colchicina no ciclo celular e na velocidade de migração dos ameloblastos em incisivos inferiores de camundongos estudados radioautograficamente após a injeção de 3H-Timidina. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.36, n.2, p.286-294, 1984.

- SERENO, M.J.C.M.; FERNANDES, M.I.M.; ZANETTINI, M.H. Effects of pesticides, fungal diseases and pests on the meiotic behavior of wheat. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.4, n.4, p.593-609, 1981.
- SIAME, B.A.; WEERASURIYA, Y.; WOOD, K.; EJETA, G.; BUTTLER, R.G. Isolation of strigol, a germination stimulant for *Striga asiatica*, from host plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.41, n.9, p.1486-1491, 1993.
- SOUZA, I.F.; SOUZA, C.N. Potencial alelopático de sorgo: extração e ação de sorgoleone sobre plântulas de soja. Lavras: ESAL, 1991. (Relatório de Pesquisa)
- SPANÓ, M.A. ; TAKAHASHI, C.S. Effects of niridazole on *Drosophila melanogaster* and cytogenetic evaluation in rat bone marrow and onion root-tip cells. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 4, n. 2, p. 103-115, 1981.
- TAMURA, S.; CHANG, C.; SUZUKI, A. Chemical studies on clover sickness, Part I. Isolation and structural elucidation of two new isoflavonoids in red clover. **Agricultural Biological Chemical**, v.33, p.391-397, 1969.
- TUKEY, J.R.H.B. Implications of allelopathy in agricultural plant science. **Botany Review**, Lancaster, v.1, n.35, p.1-16, 1969.
- TURKULA, T.E.; JALAL, S.M. Increased rates of sister chromatid exchanges induced by the herbicide 2,4-D. **The Journal of Heredity**, Baltimore, v.76, p.213-214, 1985.
- WEERASURIYA, Y.; SIAME, B.A.; HESS, D. EJETA, G.; BUTLER, R.G. Influence of conditions and genotype on the amount of striga germination stimulants exuded by root of several host crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.41, p.1492-1496, 1993.

**APÉNDICE**

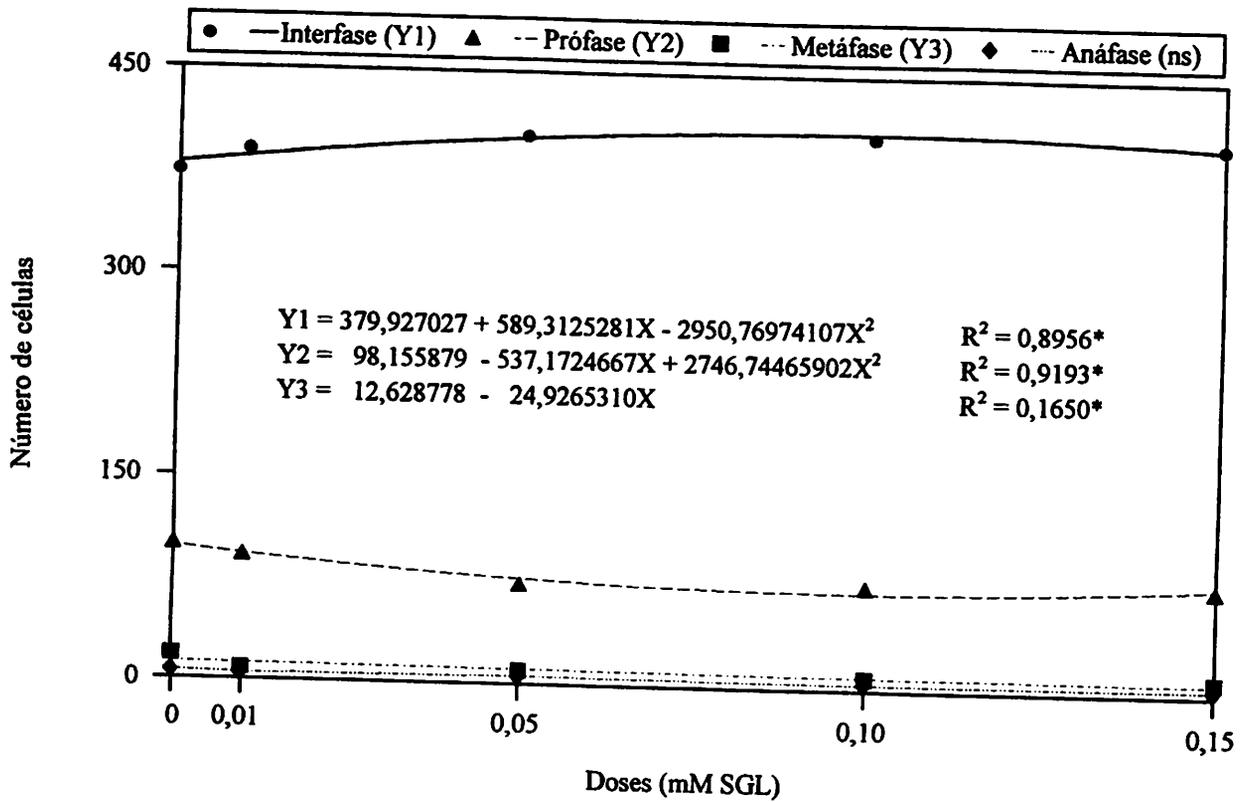


FIGURA 1A. Efeito das doses de SGL sobre o ciclo celular do feijoeiro.

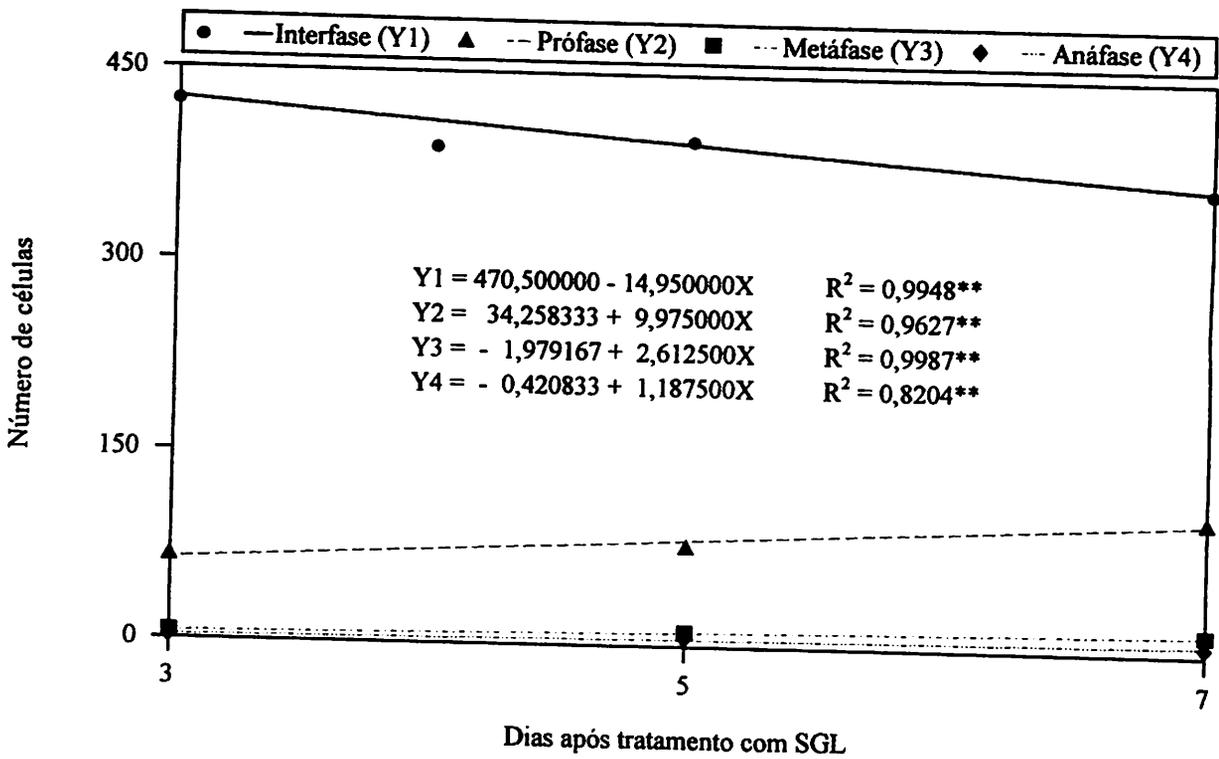


FIGURA 2A. Efeito do tempo de tratamento do SGL sobre o ciclo celular do feijoeiro.