

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E EFEITOS ALELOPÁTICOS DE EXUDATOS RADICULARES DE PLÂNTULAS DE SORGO SOBRE ALFACE¹

TÂNIA MARIA L. BARBOSA², FRANCISCO A. FERREIRA³, ITAMAR F. DE SOUZA⁴, LUIZ CLÁUDIO DE A. BARBOSA⁵ e VICENTE W. D. CASALI³

RESUMO

A análise química do exsudato radicular do sorgo resultou na identificação da quinona sorgoleona **1** e da diidroquinona **2**, como seus principais constituintes. Em testes *in vitro*, uma solução a 20 µM do exsudato causou redução de 13,1% no crescimento radicular de *Lactuca sativa* L.

Em um sistema de cultura hidropônico recirculante, o exsudato radicular produzido por quatro plantas de sorgo causou uma redução de 62,4% na área foliar da alface, 33 dias após o plantio.

Palavras chave: alelopatia, *Sorghum bicolor*, sorgoleona, *Lactuca sativa*.

ABSTRACT

Chemical characterization and allelopathic effects of radicular exudates of plants of sorghum over lettuce leaves

A chemical analysis of the *Sorghum bicolor* root exudate lead to the identification of the quinone sorgoleone **1** and the corresponding dihydroquinone **2** as the major components. An *in vitro* essay have shown that at the concentration of 20 µM this exudate caused a 13.1% reduction on the

radicular growth of *Lactuca sativa* L. In a recirculating hydroponic culture system, the exudate produced by the roots of four plants of sorghum caused a 62.4% reduction on the lettuce leaf area after 33 days of planting.

Key words: allelopathy, *Sorghum bicolor*, sorgoleone, *Lactuca sativa*.

INTRODUÇÃO

O sorgo tem sido muito mencionado na literatura por promover efeitos prejudiciais às plantas cultivadas imediatamente após sua colheita (Stafford, 1964; Guenzi & McCalla, 1966; Panasiuk *et al.*, 1986 e Einhellig & Rasmussen, 1989). Seu potencial alelopático pode ser relacionado à diversidade de substâncias produzidas por seu metabolismo

secundário. Somente na década passada, no entanto, nos exsudatos radiculares das plântulas de sorgo é que foi identificada a quinona, denominada sorgoleona, e que possui elevadíssima atividade biológica (Chang *et al.*, 1986).

A grande expressão biológica da sorgoleona foi observada por Einhellig & Souza (1992), que obtiveram efeitos inibitórios do crescimento radicular em várias

¹ Recebido para publicação em 06/02/97 e na forma revisada em 08/12/98.

² CNCO-EMBRAPA, Fazenda Três Lagoas, km 4, C.P. D-10, CEP 26011-970, Sobral/CE.

³ Professor Adjunto, Dept^o de Fitotecnia da UFV. CEP 36571-000, Viçosa/MG.

⁴ Professor Adjunto, Dept^o de Agricultura da UFLA. CEP 37200-000, Lavras/MG.

⁵ Professor Adjunto, Dept^o de Química da UFV. CEP 36571-000, Viçosa/MG.

espécies de plantas daninhas usando uma solução nutritiva com concentração de sorgoleona de 10 μM , pois a maioria dos compostos alelopáticos conhecidos são ativos numa concentração 10 a 100 vezes maior.

As plantas exsudam naturalmente compostos orgânicos, alguns dos quais possuem propriedades alelopáticas. As quantidades produzidas desses compostos variam de acordo com a espécie e idade das plantas e ainda com as condições nas quais as plantas se encontram. De acordo com os estudos realizados, não é possível afirmar se as substâncias alelopáticas encontradas no solo provêm diretamente das raízes ou são produzidas pelos microrganismos associados, ou resultam da decomposição de resíduos orgânicos, nos quais incluem-se as células mortas das raízes (Einhellig, 1986).

Para o estudo *in vivo* de exsudatos radiculares do capim hermatría (*Hermathria altissima*) Tang & Young (1982) desenvolveram metodologia que utiliza um circulador de solução nutritiva irrigando continuamente o sistema radicular da planta. Este método utiliza uma coluna contendo resina hidrofóbica capaz de adsorver metabólitos liberados pelas raízes. Tal método de coleta mostrou-se altamente eficiente quando comparado aos métodos convencionais de extração direta usando solventes, uma vez que o sistema radicular não foi danificado nem ocorreram interferências de microrganismos em razão da esterilização do solo. Netzly & Butler (1986) verificaram a natureza das substâncias dos exsudatos radiculares do sorgo e observaram a atividade biológica, confirmando o potencial de inibição do crescimento em algumas espécies.

Este ensaio objetivou identificar os constituintes químicos dos exsudatos radiculares do sorgo 'BR 007A' e avaliar seus efeitos alelopáticos, sobre a alface 'AG 549'.

MATERIAL E MÉTODOS

Eficiência de produção de exsudatos radiculares

Sementes de sorgo 'BR 007A', obtidas do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS), foram germinadas sobre papel germiteste em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, na proporção de dez sementes por placa, a aproximadamente 25°C. Após sete dias, as raízes dessas plântulas foram submersas por dois segundos em uma solução de ácido acético em diclorometano (0,25% v/v, 100 ml). Após completa evaporação do solvente à temperatura ambiente, o exsudato foi obtido como um resíduo alaranjado escuro (adaptado de Netzly *et al.*, 1988).

Caracterização química

A purificação do exsudato por cromatografia em camada delgada foi realizada aplicando-se 20 mg do exsudato (em 1,0 ml de diclorometano) em uma placa de sílica gel medindo 10 x 20 cm e espessura de 1 mm, fazendo-se a eluição com uma mistura de metanol: éter etílico (2:98 v/v).

O composto, com fator de retenção (R_f) de 0,75, foi extraído com metanol e, após evaporação do solvente, obteve-se um resíduo alaranjado-escuro.

Antes e após a purificação, o exsudato foi submetido à caracterização por espectroscopia no infravermelho. O espectro no infravermelho foi obtido em pastilha de KBr, em um aparelho Shimadzu IR408. O espectro da amostra antes e após a purificação foram praticamente idênticos, sugerindo que o exsudato era composto por um componente principal. Este espectro apresentou as seguintes absorções principais: 3300 (OH), 3020, 2940, 2850, 1670 (C=O), 1600 (C=C), 1450, 1200 e 700 cm^{-1} .

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de H) foi obtido em um aparelho Bruker WM 300 (300 MHz), no Departamento de Química da UNICAMP, utilizando-se CDCl_3 como solvente e tetrametilsilano como padrão interno.

Ensaio em laboratório

A avaliação dos efeitos alelopáticos dos exsudatos radiculares do sorgo, coletados em condições de laboratório, foi realizada semeando-se dez sementes de alface 'AG 549' sobre dois discos de papel germiteste acondicionados em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, sendo os papéis e as placas previamente autoclavados. As sementes de alface foram desinfetadas pela imersão por 1 minuto, em solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, seguida de lavagem em água desmineralizada. Sete dias após a semeadura, foram coletados os exsudatos radiculares do sorgo 'BR 007A'. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições e os tratamentos constaram de cinco concentrações de sorgoleona (0; 5; 10; 15 e 20 μM), cujo controle foi o metanol utilizado como veículo para os exsudatos radiculares de natureza hidrofóbica. As concentrações foram aplicadas sobre os discos de papel germiteste, no volume de 3 ml da solução de sorgoleona em metanol. Aproximadamente 15 horas após a aplicação da solução de metanol, as placas que ficaram destampadas para evaporação do metanol receberam 4 ml de água desmineralizada e autoclavada e, em seguida, foi realizada a semeadura da alface. As avaliações foram feitas seis dias após a semeadura, considerando o comprimento radicular e comprimento do hipocótilo das plântulas de alface. Foram feitas análises de variância (em anexo) dessas características e de regressão linear para o comprimento radicular e do hipocótilo.

Ensaio no circulador de solução nutritiva em casa-de-vegetação

Instalação do circulador de solução nutritiva

A avaliação dos efeitos alelopáticos dos exsudatos radiculares do sorgo foi realizada utilizando-se o sistema de circulação contínua de solução nutritiva (Figura 1). A estrutura física, para suporte do circulador, foi construída em madeira,

medindo 1,20 m e 0,60 m na maior e menor alturas, respectivamente, e 1,60 m de largura.

Na construção do circulador, todos os materiais usados eram de natureza inerte, tais como os vasos de borossilicato de 3 e 5 L para as plantas de sorgo e alface, respectivamente, e tubulações de silicone e teflon medindo 6 mm de diâmetro interno. Como substrato, utilizou-se areia lavada e colocada sobre uma peneira de teflon, que foi localizada na saída do gargalo do vaso e coberta por uma fina camada de lã de vidro silanizada e uma camada de brita de origem granítica. As conexões foram feitas com tubos de vidro. Os vasos foram distribuídos em forma de degraus, para que as plantas de sorgo ficassem num nível superior ao das plantas de alface, durante o funcionamento do circulador de solução nutritiva.

O volume inicial da solução nutritiva, 20%, de Hoagland & Arnon (1950), suficiente para o equipamento funcionar, foi de 2.200 ml. A vazão foi controlada em dois pontos no circulador, sendo um no nível mais inferior da tubulação e o outro na maior altura do sistema circulante. O fluxo foi mantido constante de modo que sua vazão foi de 600 ml h^{-1} , o que foi conseguido por meio de presilhas de metal conectadas às mangueiras de silicone que uniam as tubulações nos pontos mencionados. A quebra da coluna de ar, no interior dos tubos, foi obtida por meio de compressores de ar de 6,2 W.

O fluxo da solução foi controlado por uma presilha localizada entre a tubulação de vidro que sai do vaso a um nível mais baixo do sistema e a conexão em forma de epsilon. O ponto onde o controle do fluxo foi mais preciso situou-se antes da abertura dupla do epsilon, pois uma extremidade desta conexão recebe a solução circulante enquanto a outra recebe o ar proveniente do compressor.

Calculou-se o volume de reposição da solução nutritiva que, nesse ensaio, foi acompanhada por medições em cada parcela, possibilitando que todos os tratamentos recebessem o mesmo volume.

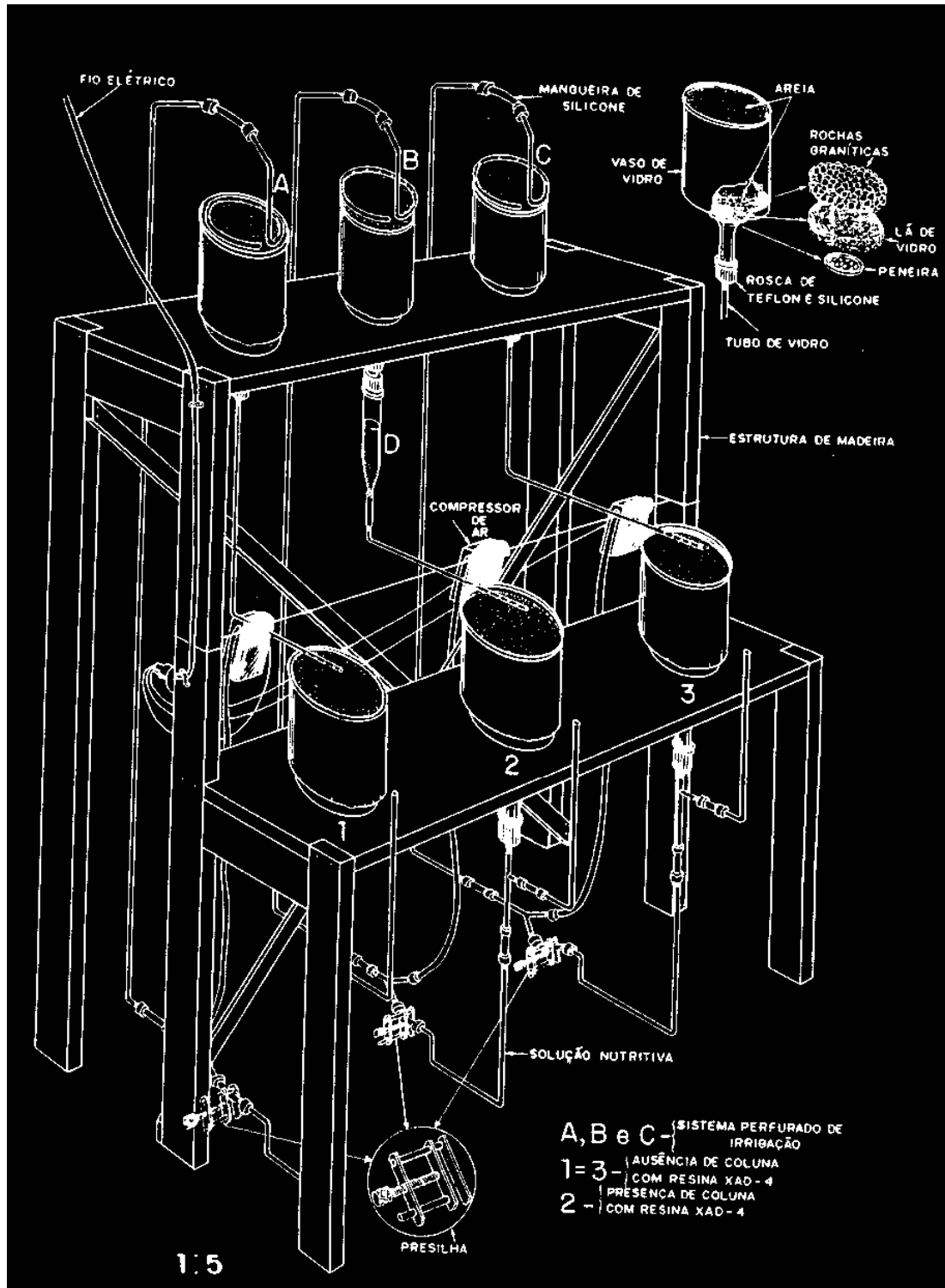


FIGURA 1. Circulador de solução nutritiva (adaptado de TANG e YONG, 1982) para estudos de interações alelopáticas entre plantas por meio de exsudatos radiculares.

Esse ajuste do volume foi possibilitado pelo uso de uma tubulação, descrita na ilustração do trabalho de Tang & Young (1982).

A solução nutritiva

A solução nutritiva utilizada foi a de Hoagland & Arnon (1950) diluída cinco vezes, modificada quanto à concentração de ferro, e ajustada para pH 5,5. A solução foi preparada com água deionizada e sais p.a., com a seguinte composição: 3,0 mM de N (2,8 mM como NO_3^- e 0,2 mM como NH_4^+); 0,2 mM de P; 1,2 mM de K; 0,8 mM de Ca; 0,4 mM de Mg; 0,4 mM de S; 30,4 μM de Fe; 9,26 μM de B; 0,06 μM de Cu; 1,82 μM de Mn; 0,16 μM de Zn e 0,02 μM de Mo.

A reposição do volume da solução nutritiva, consumido pelas plântulas de sorgo e alface ou por evapotranspiração, foi realizada adicionando-se 100 a 200 ml em cada vaso com a planta de alface, duas vezes ao dia, de acordo com o maior consumo ou elevação da temperatura ambiente. Para evitar maiores contaminações com algas, os sistemas de tubos e vasos foram totalmente recobertos com tinta e papel alumínio.

Delineamento experimental, tratamentos e características avaliadas

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições e seis tratamentos: 0, 4, 8, 12, 14 e 16 plantas de sorgo por vaso e uma planta de alface em outro vaso correspondente, interligados.

Após 33 dias do plantio, as plantas de alface e sorgo foram removidas dos vasos por meio de lavagem com água corrente sobre peneira. A parte aérea foi separada da raiz, sendo ambas colocadas em sacos com vedação para posteriores determinações de matéria seca e área foliar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Eficiência de produção e caracterização química da sorgoleona

Em condições de laboratório, sete dias após a semeadura foram coletadas 1,5 mg de exsudato radicular do sorgo 'BR 007A' por 100 plântulas. A quantidade de sorgoleona obtida (1,5 mg/100 plântulas) pela linhagem 'BR 007A' é comparável aos valores de 1,3-1,8 mg/100 plântulas, encontrados por Einhellig & Souza (1992) e 1,2-1,5 mg/100 plântulas, mencionados por Rasmussen *et al.* (1992).

TABELA 1. Dados de RMN de H (300 MHz) dos componentes (1) e (2) presentes no exsudato radicular do sorgo 'BR 007A'

H	(1)	(2)
	δ (m, J/Hz)	δ (m, J/Hz)
6	5,84 (s)	6,42 (s)
OCH ₃	3,86 (s)	3,83 (s)
OH	7,24 (s)	7,24 (s)
8', 9', 11', 12'	5,30-5,50 (m)	5,30-5,50 (m)
14'	5,80 (m)	5,80 (m)
2 x 15'	4,98-5,10 (m)	4,98-5,10 (m)
10', 13'	2,75-2,85 (m)	2,75-2,85 (m)
1'	2,68 (dd, $J_1 \cong J_2 \cong 7,6$)	2,43 (dd, $J_1 \cong J_2 \cong 7,2$)
7'	2,00-2,11 (m)	2,00-2,10 (m)
2'-CH ₂ a 6'-CH ₂	1,15-1,50 (m)	1,15-1,50 (m)

A análise desse exsudato, realizada pela cromatografia em camada delgada em placa de sílica gel, mostrou um ponto maior com $R_f = 0,65$ (metanol : éter etílico 2:98) sob luz ultravioleta (254 nm) e um ponto menor situado na base da placa. As análises espectroscópicas (IV e RMN de H) dos exsudatos, antes e após a purificação, não revelaram diferenças acentuadas em termos de composição química e indicaram que o exsudato bruto era constituído basicamente por dois compostos.

O espectro no infravermelho do exsudato apresentou absorções em 3.330 (OH), 3.020, 2.940, 2.850, 1.670 (C = O), 1.600 (C = C do anel); 1.450, 1.400, 1.200 e 700 nm. Os dados de IV e de RMN de H (Quadro 1 e Figura 2) do exsudato bruto mostraram-se compatíveis com as estruturas (1) e (2), denominadas por CHANG *et al.* (1986) de “sorgoleones”.

Muitos dos sinais no espectro de RMN de H dos compostos apareceram como multipletos. Pelas áreas relativas dos sinais devidos ao hidrogênio H-6 (δ 6,42 (s) e δ 5,84 (s) e da metoxila OCH_3 (δ 3,83 (s) e 3,86), foi possível verificar que a mistura é composta por 68,2% do composto (1) e

31,8% do composto (2). A proporção entre as formas oxidadas (1) e reduzidas (2) é ligeiramente diferente dos valores (1 (60%) : 2 (40%)), registrados por Chang *et al.* (1986). Os resultados deste trabalho confirmaram que a composição dos compostos hidrofóbicos dos exsudatos radiculares do sorgo ‘BR 007A’ foi semelhante a dos exsudatos de outras variedades previamente estudadas.

Ensaio em laboratório

Após comprovado que os exsudatos radiculares do sorgo ‘BR 007A’ eram constituídos pelos compostos (1) e (2), apresentados na Figura 2, foram realizados ensaios *in vitro* para avaliar o efeito dessas substâncias sobre o crescimento da alface ‘AG 549’. Yu & Matsui (1994) observaram que a alface foi mais sensível do que o pepino em demonstrar os efeitos alelopáticos de substâncias que promovem autoalelopátia no pepino. Eles ainda mencionaram que a alface é freqüentemente utilizada em estudos preliminares para avaliação da fitotoxicidade de novos compostos.

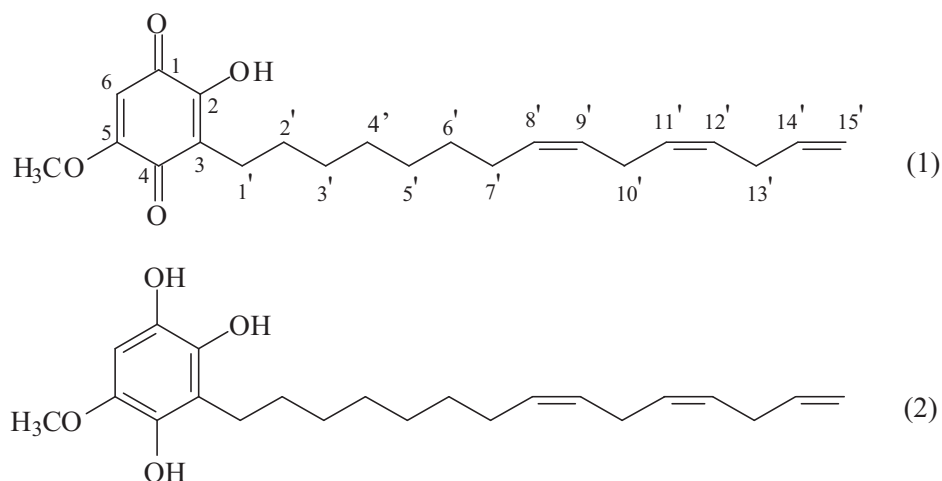


FIGURA 2. Maiores Componentes dos Exsudatos Radiculares do Sorgo ‘BR 007A’.

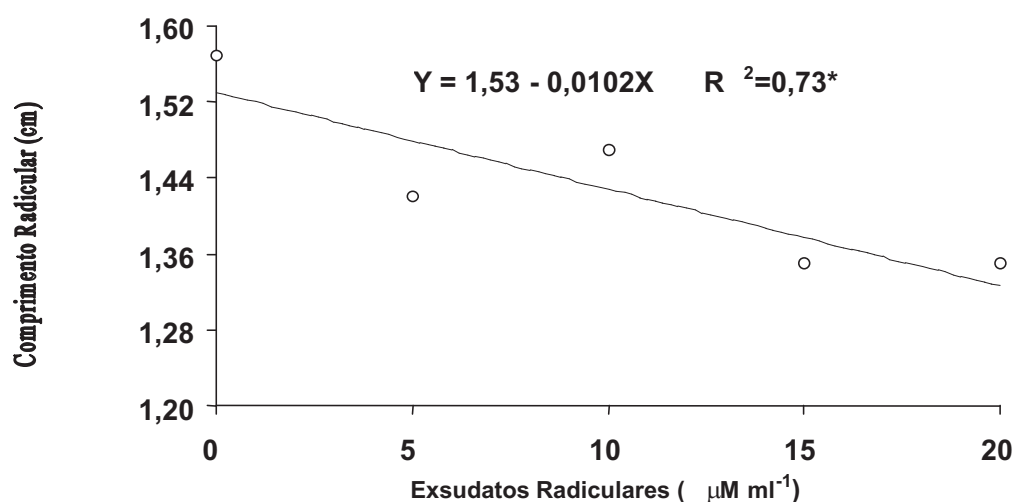
Quanto ao comprimento radicular da alface, a análise de variância da regressão detectou efeito dos tratamentos a 5% de probabilidade. A relação entre as doses dos exsudatos radiculares e o crescimento radicular foi linear, conforme Figura 3, indicando que incrementos na dose do exsudato radicular reduzem o crescimento das raízes.

Na maior concentração do exsudato radicular do sorgo, o crescimento radicular das plântulas de alface foi reduzido 13,1%, em relação à testemunha, no período experimental de seis dias. Mesmo na concentração de 5 μM de exsudato radicular, houve redução de 3,3% no crescimento das raízes. Esses dados confirmam a informação sobre a acentuada sensibilidade da radícula em demonstrar efeitos alelopáticos (Einhellig, 1989). Ainda segundo esse autor, quando se adiciona água em papel germiteste, após a remoção do solvente do composto hidrofóbico, ela causará superestimação nas doses utilizadas. Assim, os efeitos observados possivelmente ocorreram

devido a concentrações inferiores a 5, 10, 15 e 20 μM . Em geral, os compostos alelopáticos apresentam atividade biológica na faixa de 100 a 1.000 μM (Einhellig, 1986).

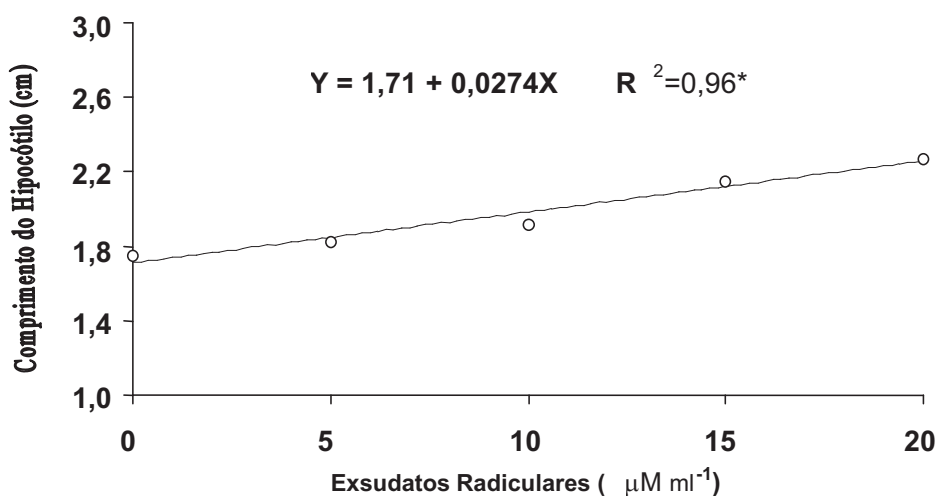
A análise de variância do comprimento do hipocótilo indicou relação linear significativa a 5% de probabilidade com as concentrações dos exsudatos radiculares (Figura 4). Foram observados aumentos no crescimento do hipocótilo com as concentrações crescentes do exsudato.

Os resultados demonstraram que o exsudato radicular foi um potente inibidor do crescimento radicular e estimulador do crescimento do hipocótilo da alface. Os resultados relativos aos efeitos de aleloquímicos sobre o crescimento do hipocótilo são pouco conhecidos na literatura, o que reforça a necessidade de estudos para comprovação do estímulo promovido do exsudato sobre hipocótilo de plantas-teste como, por exemplo, as de alface.



* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

FIGURA 3. Comprimento radicular da alface 'AG 549' em função das concentrações dos exsudatos radiculares de plântulas do sorgo 'BR 007A'.



* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

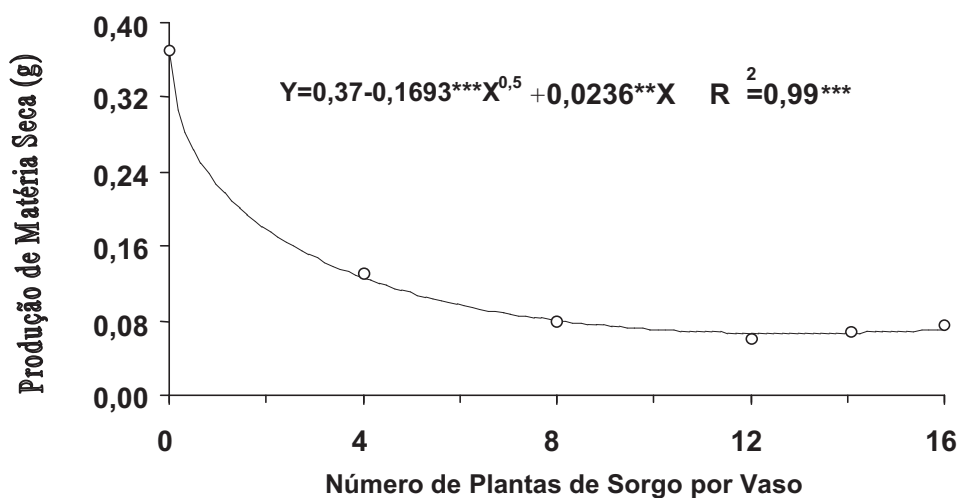
FIGURA 4. Comprimento do hipocótilo da alface ‘AG 549’ em função das concentrações dos exsudatos radiculares de plântulas do sorgo ‘BR 007A’.

Ensaio no circulador de solução nutritiva para avaliação do efeito alelopático do sorgo sobre a alface

O estudo do efeito alelopático do sorgo sobre a alface foi feita em casa-de-vegetação, utilizando-se o sistema ilustrado na Figura 1.

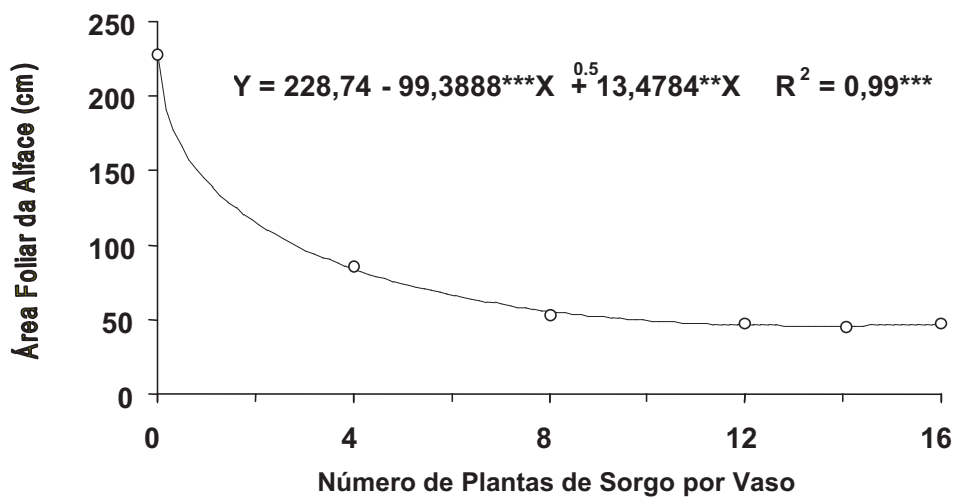
As análises de variância do peso de matéria seca e da área foliar da alface mostraram que essas características foram influenciadas significativamente, a 1% de probabilidade, pelas densidades de plantas de sorgo. Os resultados foram avaliados por meio de análise de regressão e reduções percentuais da produção de matéria seca e da área foliar da alface em relação à testemunha. O efeito da densidade de plantio do sorgo sobre a produção de matéria seca e área foliar da

alface foi raiz-quadrático (Figuras 5 e 6). A matéria seca e área foliar foram reduzidas em 78% e 76%, respectivamente, quando as plantas de alface receberam solução circulante que passava por vaso contendo 8 plantas de sorgo. Quando as plantas de alface receberam solução proveniente de um vaso contendo quatro plantas de sorgo, as reduções nas características citadas, em relação à testemunha, foram de 65% e 62,4%, respectivamente. Foi constatado efeito alelopático do sorgo sobre a alface sendo que, em 33 dias, quatro plantas de sorgo por vaso produziram substâncias alelopáticas suficientes para inibir o crescimento da área foliar da alface, em 62,4%.



*** Significativos a 0,1% de probabilidade pelo teste t.

FIGURA 5. Produção de matéria seca da alface 'AG 549' em função do número de plantas de sorgo 'BR 007A' por vaso.



*** Significativos a 0,1% de probabilidade pelo teste t.

FIGURA 6. Área foliar da alface 'AG 549' em função do número de plantas de sorgo 'BR 007A' por vaso.

LITERATURA CITADA

- CHANG, M., NETZLY, D.H., BUTLER, L.G. *et al.* Chemical regulation of distance: characterization of the first natural host germination stimulant for *Striga asiatica*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 108, p. 7858-7860, 1986.
- EINHELLIG, F.A. Interactive effects of allelochemicals and environmental stress. **Phytoc. Ecol.**, n. 9, p. 101-106, 1989.
- EINHELLIG, F.A. Mechanism and modes of action of allelochemicals. In: PUTNAM, A.R., TANG, C.S.(Eds.). **The Science of allelopathy**. New York: John Wiley and Sons. 1986. p. 171-188.
- EINHELLIG, F.A., RASMUSSEN, J.A. Prior cropping with grain sorghum inhibits weeds. **J. Chem. Ecol.**, v. 15, p. 951-960, 1989.
- EINHELLIG, F.A., SOUZA, I.F. Phytotoxicity of sorgoleone found in grain sorghum root exudates. **J. Chem. Ecol.**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 1992.
- GUENZI, W.D., McCALLA, T.M. Phenolic acid in oats, wheat, sorghum and corn residues and their phytotoxicity. **Agron. J.**, v. 51, p. 303-304, 1966.
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. S.I.: Cal. Agric. Exp. Sta., 1950. p. 347. (Circular)
- NETZLY, D.H., BUTLER, L.G. Root of sorghum exude hydrophobic droplets containing biologically active components. **Crop Sci.**, v. 26, p. 775-778, 1986.
- NETZLY, D.H., RIOPEL, J.L., EJETA, G. *et al.* Germination stimulants of witchweed (*Striga asiatica*) from hydrophobic root exudate of Sorghum (*Sorghum bicolor*). **Weed Sci.**, v. 36, p. 441-446, 1988.
- PANASIUK, O., BILLS, D.D., LEATHER, G.R. Allelopathic influence of *Sorghum bicolor* on weeds during germination and early development of seedling. **J. Chem. Ecol.**, v. 12, n. 6, p. 1533-1543, 1986.
- RASMUSSEN, J.A., HEJL, A.M., EINHELLIG, F.A. *et al.* Sorgoleone from root exudate inhibits mitochondrial functions. **J. Chem. Ecol.**, v. 18, n. 2, p. 197-207, 1992.
- STADFFORD, M.A. Flavonoids and related phenolic compounds produced in first internode of *Sorghum vulgare* Pers. in darkness and light. **Plant Physiol.**, v. 20, p. 130-138, 1964.
- TANG, C.S., YOUNG, C.C. Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of bigalta lipogress (*Hermathria altissima*). **Plant Physiol.**, v. 69, p. 155-160, 1982.
- YU, J.Q., MATSUI, Y. Phytotoxic substances in root exudates of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **J. Chem. Ecol.**, v. 20, n. 1, p. 21-31, 1994.