

**INVESTIGAÇÃO CITOGENÉTICA DO POTENCIAL
ALELOPÁTICO DE ESPÉCIES DE LÍQUENS E
PTERIDÓFITAS**

JOSÉ MARCELLO SALABERT DE CAMPOS

2004

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Campos, José Marcello Salabert de

Investigação citogenética do potencial alelopático de espécies de líquens e
pteridófitas / José Marcello Salabert de Campos – Lavras : UFLA, 2004.

86p. : il.

Orientador: Lisete Chamma Davide.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia

1. Alelopatia. 2. Citogenotoxicidade. 3. Ciclo celular. 4. Citogenética. I
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-581.524

JOSÉ MARCELLO SALABERT DE CAMPOS

**INVESTIGAÇÃO CITOGÊNÉTICA DO POTENCIAL
ALELOPÁTICO DE ESPÉCIES DE LÍQUENS E PTERIDÓFITAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Profa Dra Lisete Chamma Davide

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

JOSÉ MARCELLO SALABERT DE CAMPOS

**INVESTIGAÇÃO CITOGÊNÉTICA DO POTENCIAL
ALELOPÁTICO DE ESPÉCIES DE LÍQUENS E PTERIDÓFITAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre

APROVADA em 17 de fevereiro de 2004

Prof Dr Lyderson Facio Viccini

UFJF

Prof Dr Itamar Ferreira de Souza

UFLA

Profa Dra Lisete Chamma Davide

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

Aos nossos pais, Gregor Mendel e Barbara MacClintock, por darem o passo inicial nessa fascinante viagem pelo mundo do DNA e dos cromossomos.

OFEREÇO

Aos meus pais, Laerte e Haydee; minha irmã Ana Paula e meu sobrinho João Paulo, por serem o alicerce da minha vida, pelo amor e carinho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente, guiando os meus passos.

Aos meus familiares: meu pai Laerte Chaves de Campos, minha mãe Haydee Salabert de Campos, minha irmã Ana Paula Salabert de Campos e ao meu mais novo amor, meu sobrinho, João Paulo Campos Barquete.

À Professora Lisete Chamma Davide, pela orientação, pela confiança em meu trabalho, pelos ensinamentos e inúmeras oportunidades de aprendizagem e, acima de tudo, pelo imenso carinho e amizade.

Ao Professor Lyderson Facio Viccini, por ter despertado em mim o amor pela genética, pelos ensinamentos e por minha iniciação científica, o que certamente foi essencial por estar aqui hoje. Acima de tudo, pela grande amizade.

Ao Professor Geraldo Luiz Gonçalves Soares, pelos ensinamentos, pela amizade, pela oportunidade de trabalhar nesse projeto.

Aos professores Itamar Ferreira de Souza e Manuel Louzada Gavilanes pelas valiosas contribuições e ensinamentos.

A Professora Giovana Augusta Torres, pela amizade e valiosos ensinamentos.

Aos professores César, Magno, João Bosco, José Eduardo e Samuel, pelos ensinamentos e contribuição na minha formação profissional.

Aos amigos de turma de mestrado e aos amigos do Curso de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

A dois grandes amigos em especial, aos quais não cabem em palavras os agradecimentos, Juliane e Osnil.

Aos amigos de Laboratório de Citogenética em Lavras (Alzira, Juliane, Cássia, Josiane, Lívia, Patrícia, Sarah, Rosana, Rose, Elisa, Flávia, Larissa, Suelen, Mívia, Marcos, Alexandre, Sandro e Caio) e aos amigos de Juiz de Fora (Cristiane, Pâmela, Ana Luísa, Fernanda, Carolina, Milene, Saulo, Elisson, Ana Paula, Letícia, Profa Karla e Prof Marcelo) pelos momentos alegres, pela união e pela grande amizade que temos.

A amiga Juliana Lanna, pela grande amizade em quatro anos de graduação e pela ajuda inestimável na identificação e coleta das espécies.

Aos amigos Saulo e Pâmela, pela ajuda nas coletas, procura de referências bibliográficas e pelo presente de trabalhar em conjunto com vocês.

As minhas primeiras orientadas, Larissa e Elisa, obrigado pelo presente de trabalhar com vocês e que a gente tenha muitas conquistas nos próximos anos.

À amiga Cristiane, pela companhia sempre carinhosa e pelos momentos legais que passamos juntos nessas férias.

À grande amiga Soraya, que mesmo em pouco tempo em nosso laboratório, tem sido nossa anjinha da guarda.

À nossa amiga, companheira, da Secretaria da Pós Graduação, Elaine, sempre disposta a nos ajudar e orientar.

À equipe do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CME/UFRGS) e ao Prof^a Geraldo Luiz Gonçalves Soares pela realização dos estudos em microscopia eletrônica.

Aos funcionários da UFLA e do Departamento de Biologia.

A todos os amigos da UFLA e do Departamento de Biologia

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o êxito desse trabalho.

Não cessaremos nunca de explorar
E o fim de toda a nossa exploração
Será chegar ao ponto de partida
E conhecer o lugar pela primeira vez

T. S. Elliot, "Little Gidding"

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Alelopatia.....	3
2.2 Alelopatia em líquens.....	7
2.3 Alelopatia em pteridófitas.....	11
2.4 Plantas superiores como bioindicadoras de citogenotoxicidade.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Espécies estudadas e modelos de estudo.....	18
3.2 Coletas.....	18
3.3 Preparação dos extratos.....	19
3.4 Testes de germinação e crescimento radicular.....	19
3.5 Análise citogenética.....	19
3.6 Análise de alterações micromorfológicas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	20
3.7 Análise estatística.....	21
4 RESULTADOS.....	24
4.1 Percentagem de germinação, crescimento radicular e microscopia eletrônica de varredura após exposição aos extratos de <i>Myelochroa lindmanii</i> e <i>Canoparmelia texana</i>	24
4.2 Análise citogenética após exposição aos extratos de <i>Myelochroa lindmanii</i> e <i>Canoparmelia texana</i>	34
4.3 Percentagem de germinação, crescimento radicular e microscopia eletrônica de varredura após exposição aos extratos de <i>Gleicheniella pectinata</i> e <i>Dicranopetris fleuxuosa</i>	45
4.4 Análise citogenética após exposição aos extratos de <i>Gleicheniella pectinata</i> e <i>Dicranopetris fleuxuosa</i>	52
5 DISCUSSÃO.....	59
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
Anexo.....	86

RESUMO

CAMPOS, José Marcello Salabert de. **Investigação citogenética do potencial alelopático de espécies de líquens e pteridófitas**. LAVRAS: UFLA, 2004. 87p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)*

O potencial alelopático de duas espécies de líquens (*Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana*) e duas espécies de pteridófitas (*Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa*) foi avaliado por meio dos efeitos dos extratos aquosos sobre percentual de germinação, crescimento radicular e análise citogenética de *Lactuca sativa* e *Zea mays*. Os extratos foram obtidos por maceração em água destilada (concentração 1/10). Os tratamentos foram dispostos no delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições. O percentual de germinação e o crescimento radicular foram avaliados em 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas após exposição aos extratos. Após 36 horas de exposição, 8 raízes de cada repetição foram coletadas para análise citogenética. As lâminas foram preparadas pela técnica de secagem ao ar. Redução no percentual de germinação e/ou crescimento radicular e alterações no ciclo celular e na estrutura cromossômica foram observados após tratamento. As alterações citogenéticas observadas foram pontes, cromossomos pegajosos, fragmentos cromossômicos, migração tardia, duplicação cromossômica, morte celular e c-metáfases, observando-se aumento das diferentes anormalidades após tratamento com os extratos aquosos das quatro espécies. *Myelochroa lindmanii* apresentou, como principal efeito a indução de c-metáfase, morte celular e cromossomos pegajosos. C-metáfase foi particularmente importante por representar um efeito sobre a organização de microtúbulos, hipótese reforçada pela observação de células com duplicação cromossômica e migração tardia de cromossomos. O mesmo efeito não foi observado para os tratamentos com *Canoparmelia texana*. Esta espécie causou aumento do número de morte celular e cromossomos pegajosos como efeitos mais evidentes. Os tratamentos com os extratos aquosos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa* provocaram, como efeitos mais evidentes, a ocorrência de cromossomos pegajosos e morte celular. A análise dos dados em diferentes épocas de coleta, revelou que os efeitos foram mais evidentes em épocas chuvosas.

* Comitê Orientador: Profa Lisete Chamma Davide (Orientador), Lyderson Facio Viccini - UFJF, Geraldo Luiz Gonçalves Soares - UFJF.

ABSTRACT

CAMPOS, José Marcello Salabert de. **Cytogenetic investigation of the allelopathic potential of lichens and pteridophytas species.** LAVRAS: UFLA, 2004. 87p. (Dissertation - Master in Genetics and Plant Breeding)*

The allelopathic potential of two species of lichens (*Myelohroa lindmanii* and *Canoparmelia texana*) and two species of pteridophytas (*Gleicheniella pectinata* and *Dicranopteris flexuosa*) was evaluated by the effects of its aqueous extracts on germination, root growth and cytogenetic analysis in seeds of lettuce (*Lactuca sativa*) and maize (*Zea mays*). The extracts were obtained by leaf maceration in the distilled water (1/10). The treatments have been arranged in a completely random design with 4 replications. Percent germination and root growth were evaluated at 12, 24, 36, 48, 60 and 72h after exposition. After 36h, eight roots were collected for cytogenetics analysis. The slides were prepared by the air drying technique. The four species showed allelopathic effect in all analysis accomplished. The aqueous extracts of the four species reduced percent germination and/or root growth. Furthermore, disturbance in the cell cycle and chromosome structure were observed after treatment. The cytogenetics alterations observed were, bridges, sticky chromosome, chromosome fragments, late segregation, chromosome duplication, cell death and c-metaphase. Frequencies of the different abnormalities were increased after treatments with aqueous extract of all species. Extract from *Myelohroa lindmanii* present as main effect the induction of c-metaphases, cell death and sticky chromosome. The c-metaphase alteration is particularly important for it represent an effect on the microtubule assembly. This hypothesis is supported by the observation of chromosome duplication and late segregation. After treatment with extract from *Canoparmelia texana* the same effect was not observed. The treatment with this specie cause increase of number the cell death and sticky chromosome as effect more evident. Extracts from *Gleicheniella pectinata* and *Dicranopteris flexuosa* caused more sticky chromosomes and cell death. Extracts obtained in diferentes seasons revealed that allelopathic potential this species were more evident in the periods with higher rain intensity.

* Guidance Committee: Prof^a Dr^a Lisete Chamma Davide (Major Professor), Lyderson Facio Viccini - UFJF, Geraldo Luiz Gonçalves Soares - UFJF.

INTRODUÇÃO

O registro de que espécies vegetais podem interferir no crescimento de outras vem desde 500 a.C. Entretanto, somente em 1937, Molisch designou o termo alelopatia para descrever este fenômeno. Desde então, este termo vem sendo amplamente modificado e atualmente é aceito para designar todas as interferências entre plantas, líquens, microorganismos, vírus e fungos que afetam o crescimento ou desenvolvimento de outras espécies. Em geral, essa interferência ocorre pela liberação de metabólitos secundários por esses organismos.

Entre os organismos com potencial ação alelopática estão os líquens e as pteridófitas. Existem evidências de que os metabólitos secundários produzidos por líquens podem exibir uma enorme variedade de efeitos alelopáticos. Essa ação é particularmente importante na defesa desses organismos. Ao mesmo tempo, não são poucos os trabalhos que avaliam o potencial alelopático de espécies de pteridófitas.

O estudo do potencial alelopático desses organismos é o ponto de partida para a identificação de espécies com inúmeras aplicações em biologia e medicina, além de contribuir para o entendimento das relações ecológicas. A utilização da citogenética vegetal possibilita investigar os mecanismos de ação dos extratos dessas espécies. Essa linha de pesquisa permite a identificação de efeitos sobre o ciclo celular e alterações cromossômicas. De modo geral são observadas alterações no percentual de células em divisão, modificações na velocidade de divisão celular e alterações cromossômicas (pontes em anáfase/telófase; cromossomos pegajosos; duplicação cromossômica; migração tardia; fragmentos entre outras). O estudo desses efeitos permite a avaliação de espécies com potencial para a bioprospecção de substâncias ativas com inúmeras aplicações. Como exemplos de sucesso, pode-se citar o isolamento do ácido

úsrico, um metabólito exclusivo de espécies de líquens, amplamente utilizado medicinalmente devido a suas ações; o taxol e a colchicina, isolados de espécies de plantas, utilizados como antimitóticos.

A maioria dos estudos em alelopatia refere-se apenas ao efeito dos extratos ou substâncias alelopáticas sobre a germinação e o crescimento da planta-teste, sem considerar os eventos celulares relacionados às mudanças fisiológicas. Neste contexto, os estudos de citogenética com finalidade de verificar os efeitos causados pela ação de extratos aquosos de espécies alelopáticas podem contribuir significativamente para a elucidação dos mecanismos de ação dessas espécies.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Alelopatia

A alelopatia é um processo pelo qual os produtos do metabolismo secundário de uma determinada espécie são liberados no ambiente agindo de forma benéfica ou prejudicial sobre outra espécie (Kuiters et al., 1986; Miller, 1996; Xuan et al., 2002).

O conhecimento de que uma espécie pode interferir em outra não é uma observação recente. Existem registros feitos por Democritos (500 a.C.), Theophrastus (300 a.C.), Plínio (1 d.C.), Culpeper (1633), Browne (1658), Yong (1804), De Candolle (1832) e Beobachter (1845), (citados por Rice, 1984), sobre a capacidade que certas plantas possuem de interferir na fisiologia de outras espécies.

O termo alelopatia foi criado por Molisch (1937), em seu trabalho “Der einfluss einer pflanze auf die andere – Allelopathie” (A influência de uma planta sobre outra – Alelopatia) para designar todas as interferências desencadeadas entre plantas, provocadas pela liberação de substâncias químicas por meio de tecidos vivos ou mortos (citado por Zeng et al., 2001). Deste então, este termo vem sendo constantemente modificado e, em 1996, a IAS (International Allelopathy Society), ampliou a definição de alelopatia aos processos que envolvem a liberação de metabólitos secundários por plantas, líquens, microorganismos, vírus e fungos que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos (Malheiros & Peres, 2001). Entre os organismos influenciados (tanto negativamente quanto positivamente) estão as plantas e algas (Pandey, 1996), fungos, especialmente micorrizas (Boufalís et al., 1994; Bindu et al., 1998), bactérias e outros microorganismos (Souto et al., 1996), além de insetos e outros animais, tais como nematóides (Vaughn et al., 1998).

Embora a alelopatia possa ser um mecanismo comum aos mais diversos organismos, é nas plantas que ela é mais comum e evidente. O acúmulo de substâncias com efeitos alelopáticos tem sido verificado em todos os órgãos vegetais, havendo uma tendência de acúmulo nas folhas. A liberação desses compostos pode ocorrer por lixiviação, decomposição, exsudação da raiz ou por volatilização direta (Reigosa et al., 1999; Cruz et al., 2000; Xuan et al., 2002). Adicionalmente, Gressel & Holm (1964), Elmore (1980) e Friedman & Waller (1983) relataram que os aleloquímicos podem ser liberados pelas sementes no solo. A decomposição tem sido apontada como sendo a mais importante fonte de aleloquímicos (Souto et al., 1995; Reigosa et al., 1996).

Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos. Os primeiros, essenciais a todos os seres vivos, são os metabólitos primários e o segundo grupo, os metabólitos secundários. Estes geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, marcantes atividades biológicas e, diferentemente daqueles do metabolismo primário, são encontrados em concentrações relativamente baixas e em grupos específicos de plantas (Poser & Mentz, 2000).

Nos últimos anos, descobriu-se que, em muitos casos, os metabólitos secundários têm uma função no organismo do qual se originam. Até então, eles eram considerados como subprodutos do metabolismo primário (Malheiros & Peres, 2001). As substâncias alelopáticas classificam-se entre os metabólitos secundários (Janzen, 1980).

Atualmente, são conhecidos cerca de 10.000 metabólitos secundários com ação alelopática, o que é considerado apenas uma pequena parte da quantidade existente na natureza. Os compostos já identificados pertencem a diversos grupos químicos, atribuindo-se maior importância aos terpenos, alcalóides e compostos fenólicos (Reigosa, 1999). Entretanto, muitas moléculas de diferentes grupos têm sido demonstradas como potenciais compostos alelopáticos (Fisher et al., 1994; Einhellig, 1995; Mizutani, 1999; Hiradate et al.,

1999; Zeng, et al., 2001; Eljarrat & Barceló, 2001; De Feo et al., 2002; Fortuna et al., 2002; Scrivanti et al., 2003; Noguchi, 2003).

Ao mesmo tempo, a função de um grande número de metabólitos secundários, bem como dos seus mecanismos de ação é desconhecida, despertando o interesse de um grande número de profissionais (Heldt, 1997).

Dentre as substâncias já estudadas, os modos de ação são os mais diversos. Como exemplos, podemos citar: efeitos sobre a divisão celular (Muller, 1965; Pires et al. 2001; Campanella et al., 2002; Borah & Talukdar, 2002); o alongamento celular (Jankay & Muller, 1976); a estrutura celular (Larber & Muller, 1976); a parede celular (Zobel & Lynch, 1997); a abertura estomática (Einhellig et al., 1970), a fotossíntese (Mersie & Singh, 1993; Baziramakenga et al., 1994); a respiração (Boufalis & Pellissier, 1994; Prasad & Subhashini, 1994; Peñuelas et al., 1996). Além desses, observa-se também ação sobre fitohormônios interferindo no crescimento (Lee, 1977); modificações na permeabilidade da membrana e funções de ATP-ase (Baziramakenga et al, 1995; Calera et al., 1995; Friebe et al., 1997); alterações na capacidade de entrada de nutrientes nas células (Yu & Matsui, 1997); interferência na síntese de proteínas e ácidos nucleicos (Vyvyan, 2002) e alterações do DNA (Seigler, 1996).

Os efeitos alelopáticos raramente são provocados por uma única substância, sendo mais comum que o efeito se deva a um conjunto delas. Em geral, a concentração de cada metabólito está abaixo do mínimo necessário para que atue isoladamente, cabendo o resultado final à ação aditiva e sinérgica entre eles e os efeitos ambientais (Einhellig, 1996). O fato de uma mesma substância afetar diversas funções fisiológicas da planta, assim como a constatação de que uma mesma função pode ser afetada por mais de um composto, é mais um fator que complica o entendimento das inter-relações entre efeitos e causas (Einhellig et al., 1995; Seigler, 1996).

Desse modo, o desenvolvimento de bioensaios que procurem avaliar se um extrato, fração ou composto, possui atividade alelopática é essencial. O

experimento deve informar o efeito de uma planta doadora sobre uma receptora. Diversas metodologias estão disponíveis na literatura para o estudo do potencial alelopático (Putnam & Duke, 1978; Reigosa et al., 1996). Um grande número de bioensaios diferentes tem sido realizado, mas muitos relacionados simplesmente com testes de germinação, vistos que são ensaios simples, rápidos e requerem pequenos volumes de solução (Malheiros & Peres, 2001). Para sementes de culturas, as quais em geral têm alto poder de germinação, avalia-se somente a inibição, enquanto a estimulação causada por muitos aleloquímicos não é detectada. Tal resposta é, na maioria das vezes, observada em sementes silvestres (Leather & Einhellig, 1986).

Além dos ensaios de germinação, ensaios de crescimento e desenvolvimento também são usados para demonstrar atividade alelopática. Avalia-se, neste caso, o comprimento da radícula e do hypocótilo (Malheiros & Peres, 2001). Na grande maioria das vezes, os resultados são expressos na forma de percentagem de germinação.

Alguns modelos de quantificação (modelos matemáticos) são usados para prever efeitos alelopáticos na prática (An et al., 1993). Uma das sementes mais amplamente usada nos bioensaios são as de alface (*Lactuca sativa*), pois além de serem sementes pequenas, possuem grande superfície de contato, fazendo com que sejam bastante sensíveis ao meio que as rodeia, não requerendo nenhuma manipulação além do contato com o meio (Malheiros & Peres, 2001).

Diante da simplicidade dos testes de germinação e análise do crescimento radicular, evidencia-se a importância do desenvolvimento de novas metodologias para o entendimento dos efeitos alelopáticos exercidos pelos mais diversos organismos. Neste contexto, a citogenética pode ser uma ferramenta útil na elucidação dos mecanismos de ação de substâncias alelopáticas. Vários trabalhos têm demonstrado o efeito de substâncias e extratos sobre a divisão celular e estrutura dos cromossomos.

2.2 Alelopatia em líquens

Os líquens são uma associação simbiótica entre fungos (micobiontes) e algas ou cianobactérias (fotobiontes). As algas realizam a fotossíntese e produzem carboidratos para uso próprio e para o fungo. Em contrapartida, os fungos fornecem uma proteção física e suplemento de água e minerais para a associação (Cocchietto et al., 2002). Cerca de 21% dos fungos são capazes de agir como micobiontes nessas associações e, entre esses, 98% são ascomycetos (Honegger, 1991). Mais de 200 espécies de algas e cianobactérias podem agir como fotobiontes (Cocchietto et al., 2002). Cerca de 17.000 espécies de líquens são conhecidas até o momento e aproximadamente 12 espécies novas são descritas a cada ano (Cocchietto et al., 2002). Esses organismos colonizam um enorme número de substratos diferentes como rochas, cascas de árvores, metal, capim e solo desprotegido. São capazes de resistir a condições ambientais extremas e sua resistência deve-se principalmente à sua capacidade de sobreviver em um estado metabólico basal por meses e à produção de muitos metabólitos secundários que oferecem proteção química (Cocchietto et al., 2002).

Os metabólitos secundários de líquens têm chamado a atenção de especialistas da área de química de produtos naturais há mais de 100 anos. Cerca de 500 substâncias liquênicas diferentes já foram descobertas, dentre as quais, 350 são produtos exclusivos de espécies de líquens (Lawrey, 1995). A maioria dessas substâncias são ácidos fenólicos que chegam a atingir de 1 a 2% do peso seco do talo liquênico (Marcano, 1994; Lawrey, 1995; Elix, 1996). Outras classes de substâncias também são freqüentemente encontradas, como: derivados de aminoácidos, polissacarídeos, ácidos alifáticos, lactonas, compostos aromáticos, quinonas, xantonas, dibenzofuranos, terpenóides, esteróides e carotenóides (Huneck & Yoshimura, 1996). Segundo estes autores a produção dessas substâncias com um custo energético só pode ser explicada por algum valor adaptativo associado a elas, estando entre as possíveis funções a

proteção contra vírus, bactérias, parasitas protozoários, animais predadores, tais como insetos e nematóides e contra vegetais competidores, além de defesa contra estresses ambientais, como luz ultravioleta (UV) e ambiente excessivamente seco, e participação na regulação fisiológica do metabolismo liquênico.

Lawrey (1995) salientou que os metabólitos secundários produzidos por líquens podem exibir uma enorme variedade de efeitos aleloquímicos. As substâncias liquênicas desempenham um papel importante na defesa contra microorganismos e herbívoros e podem exibir efeito alelopático em condições naturais. De fato, ácidos liquênicos produzidos por uma determinada espécie de líquen são capazes de suprimir o crescimento de outras espécies de líquens, de briófitas e até mesmo de plantas vasculares (Rice, 1984; Lawrey, 1995; Frahm et al., 2000).

Exemplos dessa interferência podem ser vistos entre os líquens e as briófitas. Esses organismos, embora não relacionados sistematicamente, vivem no mesmo microhabitat e frequentemente compartilham do mesmo substrato. Nessas condições, eles competem pelo mesmo espaço e o modo de vida dos líquens com suas baixas velocidades de crescimento seria um indicativo de que eles teriam uma menor competitividade. Entretanto, isso nem sempre ocorre. Frequentemente, espécies de líquens são pioneiras em cascas de árvores, no solo e em rochas, onde eles começam a sucessão acompanhados por briófitas. Assim, é comum observar, em alguns casos, uma diminuição na população de briófitas quando o substrato é colonizado por líquens. Acredita-se que essas relações, sejam influenciadas por substâncias alelopáticas produzidas pelas espécies de líquens (Frahm et al., 2000). Estes mesmos autores demonstraram que os extratos de duas espécies de líquens crostosos, *Cryptotheca sp.* e *Pertusaria sp.*, inibem a germinação dos esporos das briófitas *Ceratodon purpureus* (Ditrichaceae) e *Funaria hygrometrica* (Funariaceae). Essa capacidade de competição com as briófitas já vinha sendo demonstrada desde os estudos de

Lawrey (1977a; 1977b) com extratos dos líquens *Cladonia* spp., que inibem a germinação de 3 espécies de briófitas e de Gardner & Mueller (1981), que estudaram o efeito inibitório de ácidos liquênicos puros sobre a germinação de esporos de *Funaria hygrometrica*.

Do mesmo modo, não são poucos os trabalhos que demonstram a interferência alelopática de líquens em outras espécies de líquens, fungos e até mesmo de plantas vasculares (Lawrey, 1995).

Essa propriedade destes organismos conduziu, ao longo dos anos a diversos estudos que procuraram identificar a ação de extratos liquênicos e que levaram ao isolamento de diversas substâncias com ação biológica.

Os líquens, junto com alguns organismos marinhos e anfíbios venenosos, são as mais importantes fontes de compostos biologicamente ativos (Barnes, 2000). O primeiro estudo avaliando substâncias liquênicas data da origem da Química Orgânica, sendo que a primeira revisão foi publicada em 1858 (Gmelin, 1858). Com o desenvolvimento das técnicas de cromatografia, na década de 1960 um grande número de substâncias liquênicas foram identificadas desde então (Cocchietto et al., 2002). Particularmente importante foi a publicação de Culberson (1969) sobre a química de substâncias liquênicas, acompanhado por dois volumes suplementares (Culberson, 1970; Culberson, 1977).

Desde então, as mais diversas ações têm sido atribuídas às substâncias liquênicas, podendo-se citar entre elas, as ações antimicrobianas, antivirais, antifúngica, antitumorais, antiinflamatórias, anti-herbivoria, herbicida, cosmética, atividade citotóxica e mitodepressiva (Shibamoto & Wei, 1984; Al-Bekairi et al., 1991; Al-Bekairi & Qureshi, 1991; Proksa et al., 1996; Cardarelli et al., 1997; Ingólfssdóttir et al., 1998; Williams et al., 1998; Correché et al., 1998; Kumar & Müller, 1999; Perry et al., 1999; Vijayakumar et al., 2000; Cocchietto et al., 2002). Uma extensiva coleção de artigos que descrevem a

utilização de líquens pelo homem pode ser consultada em Sylvia Sharnoff's Database (www.lichen.com).

Uma das substâncias liquênicas mais amplamente estudada é o ácido úsnico. Esta substância foi isolada pela primeira vez em 1844 e tornou-se não somente um dos metabólitos de líquens mais estudado como um dos poucos disponíveis comercialmente (Ingólfssdóttir, 2002). O ácido úsnico é unicamente encontrado em líquens, e é especialmente abundante nos gêneros *Alectoria* (Alectoriaceae), *Cladonia* (Cladoniaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae), *Evernia* e *Parmelia* (Parmeliaceae) (Ingólfssdóttir, 2002). Muitos líquens e extratos que contêm ácido úsnico tem sido utilizados na elaboração de perfumes e cosméticos, assim como em aplicações medicinais e ecológicas. A substância pura tem sido utilizada na formulação de cremes, pastas de dente, desinfetantes bucais, desodorantes e protetores solares (Ingólfssdóttir, 2002). Em adição à atividade antimicrobiana contra patógenos humanos e de plantas, o ácido úsnico tem mostrado atividade antiviral, antiprotozoários, antiproliferativa, antiinflamatória e analgésica (Ingólfssdóttir, 2002). Efeitos ecológicos, tais como atividade anti-herbivoria, também têm sido demonstrados.

Os efeitos antimitóticos do ácido úsnico sobre células de plantas em cultura (Cardarelli et al, 1997) e a capacidade de inibir a germinação e o crescimento de plantas superiores são bem conhecidos. Em um estudo recente, em que ambos os enantiômeros foram testados para fitotoxicidade e comparados com herbicidas comerciais, o (-)-ácido úsnico foi significativamente mais potente (Romagni et al., 2000). Do mesmo modo, sua atividade antitumoral tem sido extensivamente estudada e em trabalho também recente, o (+)-ácido úsnico exibiu atividade antiproliferativa contra linhagens celulares malignas K-562, com um ED₅₀ de 4,7 µg/ml (Kristmundsdóttir et al., 2002).

Estes efeitos reforçam a importância de estudos que procurem avaliar os mecanismos de ação de extratos de espécies de líquens e que conduzam ao

isolamento de substâncias com inúmeras potencialidades de uso em biologia, medicina e agricultura.

2.3 Alelopatia em pteridófitas

Até recentemente, os estudos alelopáticos envolvendo espécies de pteridófitas restringiam-se, praticamente, à espécie *Pteridium aquilinum*, uma samambaia cosmopolita e extremamente comum no Brasil, cuja capacidade de colonizar ambientes, impedindo o estabelecimento de outras espécies vegetais, já foi relacionada ao seu potencial alelopático (Gliessman & Muller, 1978). Esta samambaia é dominante sobre uma larga esfera de hábitats, estendendo-se desde os trópicos até as margens de florestas boreais (Peres et al., 1998). Em todas essas distintas situações ecológicas, o modelo de dominância é sempre muito similar, formando populações quase puras em que poucas espécies coexistem (Gliessman & Muller, 1972; Gliessmann, 1976).

Mais recentemente, outras espécies de pteridófitas têm sido avaliadas quanto ao seu potencial alelopático.

Num estudo recente, Soares & Vieira (2000) investigaram a atividade alelopática de cinco espécies de pteridófitas da família Gleicheniaceae (*Dicranopteris flexuosa*, *Gleicheniella pectinata*, *Sticherus bifidus*, *Sticherus penniger* e *Sticherus nigropaleaceus*). Foram observados efeitos significativos de inibição da germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) para os extratos de frondes verdes de todas as espécies estudadas. Observou-se também redução significativa no comprimento das radículas após tratamento com os extratos aquosos das espécies.

Por outro lado, Peres et al. (1998) demonstraram que os extratos aquosos de *Gleicheniella pectinata* provocavam um retardo no tempo de germinação e aumentavam a taxa final de germinação de sementes de *Clidemia hirta*. Entretanto, quando foram utilizadas sementes de alface, os resultados foram consistentes com o trabalho de Soares & Vieira (2000). Esses resultados,

aparentemente contraditórios, estão de acordo com o que é geralmente observado, de que as substâncias alelopáticas são seletivas em sua ação e que as respostas das plantas também são diferenciadas. *Gleicheniella pectinata* é uma samambaia nativa do estado de Santa Catarina que cresce sobre encostas no domínio de floresta ombrófila densa e apresenta comportamento muito semelhante ao de *Pteridium aquilinum*. Segundo Queiroz (1994), *Gleicheniella pectinata* forma agrupamentos clonais praticamente puros, o que sugere um mecanismo de bloqueio alelopático da sucessão vegetal, visto que a dinâmica sucessional nesses agrupamentos é muito lenta.

2.4 Plantas superiores como bioindicadoras de citogenotoxicidade

Nos últimos anos, os bioensaios de toxicidade genética com plantas superiores por meio de detecção de alterações cromossômicas têm sido reconhecidos como excelentes indicadores de alterações genéticas provocadas pela presença de substâncias químicas (Grant 1994, 1999). A utilização de bioensaios com plantas superiores utilizadas como modelos de citogenética apresenta uma série de vantagens como citado por Grant (1999): (a) sendo organismos eucariotos, apresentam uma estrutura cromossômica similar à dos seres humanos; (b) devido ao tamanho de seus cromossomos, esses modelos são convenientes para análises citogenéticas; (c) as técnicas de detecção são de rápida execução e de baixo custo; (d) o tempo de geração de muitas plantas é de curta duração, o que possibilita verificar os efeitos em gerações subsequentes; (e) vários indicadores podem ser utilizados como, por exemplo, variações cromossômicas, mutações gênicas, alterações foliares no embrião, nos grãos de pólen, etc; (f) podem ser usadas para estudos *in situ* e *ex-situ*; (g) vários estudos mostram correlação positiva entre os efeitos encontrados nas plantas e aqueles encontrados nos mamíferos, o que facilita a detecção de genotoxicidade, uma vez que a utilização de modelos animais são muitas vezes, complexos, caros e

demorados; (h) constitui um teste altamente sensível (pouco falso-negativo) na predição de carcinogenicidade.

Diversas plantas têm sido utilizadas como modelos de estudo, podendo-se citar entre elas *Allium cepa*, *Crepis capilaris*, *Hordeum vulgare*, *Pisum sativum*, *Tradescantia*, *Vicia faba* e *Zea mays*. Algumas como *H. vulgare*, *P. sativum*, *Lycopersicon esculentum*, *Tradescantia* e *Z. mays* podem ser usadas também para análise de mutações gênicas (Grant, 1999).

Dependendo do enfoque, várias metodologias podem ser usadas com as mais variadas espécies, podendo-se citar entre elas o teste do micronúcleo (MCN) e o teste do pêlo estaminal (SHM) em *Tradescantia sp.* (Rodrigues, 1999). Essa planta apresenta apenas 6 pares de cromossomos grandes facilmente observáveis. Além disso, células de quase todas as partes da planta, da ponta da raiz ao tubo polínico em desenvolvimento, fornecem material excelente para estudos citogenéticos. Outras metodologias são a utilização do bioensaio do pólen ceroso em milho, ensaio do mosaicismo em folhas de soja e análise de células em anáfase e telófase, sendo esta última particularmente importante e descrita com mais detalhes a seguir.

Nos últimos anos, grande ênfase tem sido dada à utilização de alterações cromossômicas, em modelos biológicos específicos, como indicadoras de citogenotoxicidade (Rank & Nielsen, 1994). Os tipos de variações cromossômicas encontradas podem variar quanto ao número e quanto à estrutura dos cromossomos. No que diz respeito ao número, as alterações podem envolver um conjunto cromossômico inteiro ou apenas alguns cromossomos específicos. As alterações estruturais podem ser do tipo deficiência, duplicação, translocação e inversão (Griffiths et al., 1998).

O estudo da frequência de células em anáfase/telófase portadoras de anormalidades cromossômicas tem sido empregado para estudos de toxidez nos mais diferentes casos: metais pesados (Fiskesjö, 1985, 1988; Chaudhuri et al., 1993); 4-epoxietil-1,2-epoxy-ciclohexano (Ronchi et al., 1996); água contendo

rejeitos industriais (Rank & Nielsen, 1994); isocianato-metfílico (Kumar et al., 1989); N-metil-nitrosourea, azida sódica e etil-metano-sulfonato (Rank & Nielsen, 1997); ozônio (Rodrigues et al., 1996); chumbo (Liu et al., 1994); cobalto (Palit et al., 1994); titânio (Abraham & Abraham, 1994) e alumínio (Campos & Viccini, 2003), entre outros.

De modo geral, as fontes de propágulo (bulbos, rizomas ou sementes), após a exposição aos agentes potencialmente causadores de danos ao material genético e ao ciclo celular, são colocadas em condições apropriadas para emissão de raízes, para que, posteriormente, células meristemáticas possam ser analisadas quanto à ocorrência das alterações (Odeigah et al., 1997; Grant & Owens, 1998).

Os principais efeitos visualizados ao microscópio, são quebras cromossômicas, pontes na anáfase e telófase, fragmentos cromossômicos acêntricos, fusão entre cromossomos e alterações no ciclo celular (Rank & Nielsen, 1994; Viccini, 1998; Hallak et al., 1999; Campos & Viccini, 2003).

Diante disso, são enormes as potencialidades da utilização de estudos citogenéticos para a identificação de alterações do ciclo celular e da estrutura cromossômica induzidas por extratos de espécies com potencial alelopático. Vários trabalhos têm procurado utilizar este tipo de estratégia para a investigação de espécies alelopáticas.

Camparoto et al. (2002) analisaram o efeito de infusões de duas plantas medicinais brasileiras (*Bauhinia candicans* e *Maytenus ilicifolia*) sobre células de *Allium cepa* e de medula óssea de ratos. Uma depressão do índice mitótico significativa em relação ao controle foi observada nas concentrações mais altas de *Bauhinia candicans*. Todavia, de modo geral, não foram observadas diferenças entre o tratamento controle e os tratamentos provenientes das plantas medicinais.

O efeito citogenético do extrato da planta *Calotropis procera* sobre células meristemáticas de *Vicia faba* foi avaliado, observando-se que em baixas

concentrações os tratamentos causaram aumento do índice mitótico e estimulação da germinação. Por outro lado, os tratamentos com altas concentrações causaram redução do índice mitótico. Vários tipos de anormalidades mitóticas e meióticas foram observadas, sendo cromossomos pegajosos a mais freqüente. Os tratamentos com os extratos também afetaram o pareamento cromossômico durante a meiose (Haroun & Shehri, 2001). *Calotropis procera* tem sido extensivamente utilizada para inibir o crescimento de insetos (Nassar, 1995). Os resultados deste trabalho indicaram que o uso do extrato dessa planta como inseticida em altas concentrações também é prejudicial para as plantas. Entretanto, a utilização de uma baixa concentração (cerca de 15%) pode afetar significativamente os insetos e não causar danos às plantas.

Pires et al. (2001) estudaram o efeito do extrato aquoso de *Leucaena leucocephala* sobre o desenvolvimento e índice mitótico em plântulas de milho. Verificou-se inibição do crescimento de raízes e redução do índice mitótico proporcionalmente ao incremento da dose de extrato, não sendo observada divisão celular a partir da concentração de 1,6%.

Um decréscimo do índice mitótico dependente da concentração (1, 2, 4, 6, 8 e 10%) e da duração do tratamento (4, 12 e 24 horas), foi observado após exposição das raízes de *Helianthus annuus* ao extrato aquoso de raízes de *Boerhaavia diffusa*. Alterações cromossômicas foram observadas, sendo as principais, cromossomos pegajosos, cromossomos em anel, fragmentos cromossômicos, migração tardia de cromossomos em anáfase, pontes cromossômicas e micronúcleos (Rajendiran, 2000).

Hallak et al. (1999) demonstraram o efeito do Sorgoleone (exsudato de raízes de Sorgo) sobre plântulas de feijão de 7 dias, em concentrações acima de 0,01 mM, observando redução do número de células em divisão, quando comparadas ao controle. Alterações cromossômicas, como c-metáfases, células poliplóides, pontes e fragmentos em anáfase e telófase, foram observadas.

A avaliação, em células da linhagem CHO de hamster, do efeito do extrato aquoso da planta *Phyllanthus orbicularis*, indicou que tratamentos com concentrações acima de 10µg/ml causaram um significativo aumento do número de células mortas e redução do índice mitótico. Particularmente importante nesse trabalho, foi a observação de que, em baixas dosagens, o extrato dessa planta inibe a capacidade clastogênica do H₂O₂⁻, revelando um efeito antimutagênico (Lamar et al., 1999).

O efeito dos extratos de folhas jovens e adultas de angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina*) foi avaliado em células meristemáticas de alface (*Lactuca sativa*) e canafístula (*Peltophorum dubium*). Redução do índice mitótico e anormalidades mitóticas também foram observadas como consequências dos tratamentos (Abreu, 1997).

Giafrancisco et al. (1998) verificaram o efeito alelopático de um extrato clorofórmico de *Raphanus sativus* sobre a germinação, crescimento radicular e índice mitótico em *Chichorium intybus*. As percentagens de germinação e o crescimento radicular mostraram significativa redução com o incremento das concentrações, e a análise citogenética confirmou esses resultados pela redução do índice mitótico.

Redução do índice mitótico, dependente do tempo de tratamento foi verificada após exposição ao extrato aquoso da planta *Viscum cruciatum* (Ahumada et al., 1995).

Shehad (1980), estudando o efeito de alguns álcoois alifáticos e álcoois extraídos de *Euphoria granulata* e *Pulicaria crispa*, verificou um potente efeito antimitótico sobre células de raízes de cebola, verificando também anormalidades na divisão celular.

Em líquens, existem evidências de que ácidos fenólicos produzidos podem alterar o ciclo celular de células vegetais. Um dos primeiros estudos nesse sentido referem-se aos efeitos citogenéticos do ácido lecanórico, um metabólito de líquens, sobre raízes de *Allium sativum* (Swami & Kumar, 1976).

Como descrito anteriormente, o ácido úsnico é um dos metabólitos de líquens mais extensivamente estudado e, recentemente, foi observado o efeito antimitótico desse ácido sobre diversos sistemas biológicos, inclusive células vegetais (Cardarelli et al., 1997).

Este tipo de abordagem permite a identificação de espécies com potencial utilização na bioprospecção de substâncias com inúmeras aplicações na biologia, medicina e agricultura. Pode-se citar aqui a colchicina extraída da planta *Colchicum autumnale* e o Taxol, extraído da planta *Taxus brevifolia*, dois exemplos clássicos de substâncias que podem ser consideradas como substâncias de ação alelopática, afetando a dinâmica dos microtúbulos do fuso mitótico.

A citogenética, deste modo, pode representar uma importante ferramenta na descoberta dessas substâncias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécies estudadas e modelos de estudo

O potencial alelopático do extrato aquoso de duas espécies de líquens da família Parmeliaceae (*Myelochroa lindmanii* (Lynge) Elix & Hale e *Canoparmelia texana* (Tuckerman) Elix & Hale) e de duas espécies de pteridófitas da família Gleicheniaceae (*Gleicheniella pectinata* (Wild) Ching e *Dicranopteris flexuosa* (Schrad.) Underw) foi avaliado por meio de percentagem de germinação, crescimento radicular e análise citogenética (Figuras 1 a 4).

Como modelos para avaliação, foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) da variedade ‘Grand Rapids’ e sementes de milho (*Zea mays* L.) da linhagem L-922, proveniente da Universidade Federal de Viçosa-MG.

3.2 Coletas

As espécies foram coletadas no município de Juiz de Fora-MG (Latitude – -21,77°; Longitude – -43,35°), empregando-se a metodologia utilizada por Ribeiro (1998). Os espécimes de líquens foram coletados sem substrato, sempre que possível. Em alguns casos, devido ao ressecamento do material, foi necessária a utilização de pulverizador de água para que o espécime fosse coletado com todo o talo preservado. Para as espécies de pteridófitas coletou-se somente frondes verdes.

Quatro coletas foram realizadas com o objetivo de avaliar o efeito sazonal sobre a atividade alelopática das espécies. Essas coletas corresponderam a períodos caracteristicamente chuvosos (janeiro de 2002 e janeiro de 2003) e secos (agosto de 2002 e agosto de 2003) no município de Juiz de Fora. Os dados climatológicos foram obtidos no Laboratório de Climatologia e Análise Ambiental da Universidade Federal de Juiz de Fora (Anexo 1).

3.3 Preparação dos extratos

Os extratos das espécies foram obtidos por maceração estática a 25°C por 24 horas, obedecendo sempre a uma proporção de 1:10 (material vegetal ou liquênico para água destilada). Os experimentos visando análise do percentual de germinação, crescimento radicular e citogenética foram montados imediatamente após o preparo dos extratos.

3.4 Testes de germinação e crescimento radicular

Os experimentos para avaliação do percentual de germinação e crescimento radicular foram conduzidos com sementes de alface e milho. Os tratamentos foram dispostos no delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições representadas por uma placa de Petri (parcela experimental), dispondo-se trinta sementes de alface e dez sementes de milho por placa. O papel filtro das placas de Petri utilizadas nos experimentos foi sempre embebido com 5ml de extrato. Como controle foi utilizado somente água destilada.

O percentual de germinação e o crescimento radicular foram avaliados em 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas após o início da exposição das sementes.

3.5 Análise citogenética

Após 36 horas de exposição aos extratos, 8 raízes de cada repetição foram coletadas para análise citogenética, totalizando 32 raízes analisadas por tratamento. As raízes foram lavadas e fixadas em solução de metanol/ácido acético (3:1), por um período mínimo de 24 horas. Após a fixação, as raízes foram lavadas em água destilada e submetidas à digestão enzimática (Pectinex NOVO NORDISK), a 34°C, por 1 hora e 30 minutos e 3 horas e 30 minutos, respectivamente para raízes de alface e milho. Após a digestão, as raízes de alface foram hidrolisadas em HCl 5N à temperatura ambiente, durante 8 minutos. Esta etapa foi suprimida para as raízes de milho. As lâminas foram preparadas pela técnica de secagem ao ar com maceração enzimática

(dissociação celular) e coradas com solução de Giemsa (Carvalho & Saraiva, 1993).

Os seguintes indicadores na análise citogenética foram utilizados:

Para ciclo celular:

- **Índice mitótico (IMi)** - foram avaliadas 200 células por lâmina, totalizando 6400 células por tratamento. O IMi foi obtido dividindo-se o total de células em divisão pelo total de células avaliadas.
- **Índice metafásico (IMe)** - foi obtido dividindo-se o total de células em metafase pelo total de células avaliadas.
- **c-metáfases** - total de c-metáfases/total de metáfases avaliadas.

Para alterações citogenéticas:

- **Cromossomos pegajosos** - total de células com cromossomos pegajosos/total de células em metafase.
- **Pontes em anáfase/telófase** - total de células em anáfase e telófase com pontes cromossômicas/total de células em anáfase e telófase.
- **Fragmentos cromossômicos** - total de células com fragmentos/total de células avaliadas.
- **Migração tardia dos cromossomos** - total de células em anáfase e telófase com cromossomos com migração tardia/total de células em anáfase e telófase.
- **Duplicação cromossômica** - total de metáfases com duplicação cromossômica/total de metáfases.
- **Morte celular** - total de células mortas/total de células avaliadas.

3.6 Análise das alterações micromorfológicas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A análise das alterações micromorfológicas foi efetuada somente com raízes de alface obtidas na terceira coleta (janeiro de 2003). As raízes de alface tratadas com os extratos aquosos das espécies estudadas foram fixadas em FAA por um

mínimo de 48 horas e, posteriormente, desidratadas numa série acetônica. A desidratação foi concluída em um aparelho de ponto crítico (Bal-tec® – CPD 030). As amostras de raízes assim preparadas foram montadas com fita dupla face sobre suportes apropriados, metalizadas com ouro em metalizador Balzers Union® e visualizadas sob microscópio eletrônico de varredura JEOL® JSM 5.800. Todas as amostras foram analisadas no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CME/UFRGS). A metodologia de preparação e análise das amostras encontra-se disponível no endereço eletrônico <http://www.cme.ufrgs.br>.

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o Teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade para todas as variáveis analisadas por meio do software Sisvar para todas as variáveis analisadas.

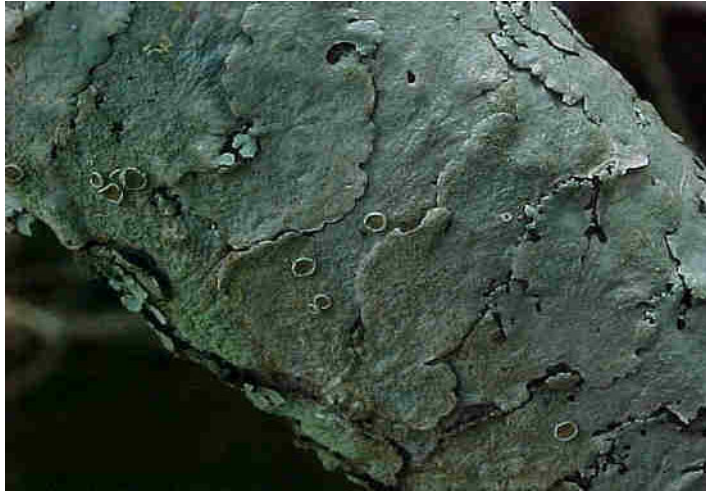


FIGURA 1 *Myelochroa lindmanii*



FIGURA 2 *Canoparmelia texana*



FIGURA 3 *Dicranopteris flexuosa*



FIGURA 4 *Gleicheniella pectinata*

4 RESULTADOS

4.1 Percentagem de germinação, crescimento radicular e microscopia eletrônica de veredura após exposição aos extratos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana*

Os resultados obtidos pela análise do percentual de germinação e crescimento radicular em alface e milho são mostrados na Tabela 1.

Ambas as espécies, *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana*, possuem atividade, interferindo na percentagem de germinação e/ou no crescimento radicular tanto em alface quanto em milho.

Myelochroa lindmanii interfere apenas no crescimento radicular, não interferindo no percentual de germinação das espécies. Em alface, é possível observar, na terceira coleta (janeiro, 2003), uma redução de 86,14% no crescimento radicular, em comparação com o controle (maior inibição encontrada). Nota-se claramente que as coletas realizadas em períodos chuvosos (janeiro de 2002 e janeiro de 2003) apresentam um maior efeito de inibição no crescimento radicular. Em média, as coletas realizadas em período chuvoso inibiram em 83,5% em comparação ao controle, enquanto no período seco foram observadas, em média, 55,5% de inibição. Em milho, o comportamento de *Myelochroa lindmanii* mostrou-se idêntico, com maior inibição na terceira coleta e maior inibição, em média, nas coletas chuvosas (Tabela 1).

Por outro lado, *Canoparmelia texana* interfere tanto no crescimento radicular como no percentual de germinação de sementes de alface e no percentual de germinação em sementes de milho. Essa interferência no percentual de germinação em sementes de alface foi observada nas quatro coletas realizadas, sendo o efeito maior na terceira coleta (janeiro de 2003) com uma redução de 31,1% no número de sementes germinadas em comparação ao controle. Em milho, esse efeito não foi tão evidente, sendo observada diferença estatística em apenas uma coleta (janeiro de 2003).

TABELA 1 Percentual de germinação e crescimento radicular (cm) após 72 h em sementes de alface (*Lactuca sativa*) e milho (*Zea mays*) após tratamento com os extratos aquosos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana*.

Tratamentos	Percentual de germinação		Crescimento radicular (cm)	
	Lactuca sativa	Zea mays	Lactuca sativa	Zea mays
Cont/jan02	96,2 a	87,3 a	2,89 a	7,8 a
Cont/jan03	94,3 a	86,4 a	2,74 a	8,2 a
Cont/ag02	95,7 a	79,3 a	1,98 a	6,9 a
Cont/ag03	92,4 a	81,2 a	2,31 a	10,1 a
<i>M.lin</i> /jan02	92,4 a	80,3 a	0,55 b	4,1 b
<i>M.lin</i> /jan03	90,1 a	75,2 a	0,38 b	3,9 b
<i>M.lin</i> /ag02	92,5 a	83,4 a	1,01 b	4,8 b
<i>M.lin</i> /ag03	94,3 a	86,3 a	0,89 b	6,3 a
<i>C.tex</i> /jan02	74,3 b	80,1 a	0,81 b	6,7 a
<i>C.tex</i> /jan03	63,2 c	69,4 b	0,75 b	5,8 a
<i>C.tex</i> /ag02	73,5 b	80,2 a	1,31 a	7,4 a
<i>C.tex</i> /ag03	69,3 b	79,8 a	1,45 a	6,3 a

* Cont – Controle; *M. lin* – *Myelochroa lindmanii*; *C. tex* – *Canoparmelia texana*; jan02 – janeiro de 2002; jan03 – janeiro de 2003; ag02 – agosto de 2002; ag03 – agosto de 2003.

** As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$).

Diferença significativa do efeito de *Canoparmelia texana* sobre o crescimento radicular só foi observada sobre sementes de alface.

Os resultados obtidos na análise do percentual de germinação em 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, após exposição aos extratos em sementes de alface para as coletas em períodos chuvosos (janeiro de 2002 e 2003) e períodos secos (agosto de 2002 e 2003) são mostrados nas Figuras 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

É possível observar que, em todas as quatro coletas, *Myelochroa lindmanii* não afeta o percentual final de germinação de sementes de alface, mas, o extrato aquoso dessa espécie causou um retardo no início da germinação. Nas coletas realizadas em períodos chuvosos, em que este efeito é mais evidente (Figuras 5 e 6), é possível observar, por exemplo, que em 12 horas, enquanto o controle tinha, em média, 20% das sementes germinadas, nenhuma das sementes

provenientes do tratamento com *Myelochroa lindmanii* havia germinado. No período de 36 horas, é possível observar diferenças de 32,3 e 33,7% no percentual de germinação em comparação com o controle, respectivamente para as coletas 1 e 3.

Canoparmelia texana, além de causar o mesmo retardo na germinação, interfere no percentual final de germinação de sementes de alface. Em todas as coletas, este efeito é evidente, com diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,05$). A época de coleta não parece influenciar nessa capacidade de *Canoparmelia texana*, embora na terceira coleta este efeito tenha sido mais evidente (Figura 6 e Tabela 1). Nesta coleta, uma diminuição de 31,1% no percentual de germinação foi causada pela ação do extrato dessa espécie.

De modo geral, analisando-se em conjunto todas as coletas, o controle apresentou, em média, 94,6% de germinação, o tratamento com *Myelochroa lindmanii* 92,3% e o tratamento com *Canoparmelia texana* 70% de germinação.

Em milho (Tabela 1), *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana* não parecem interferir de forma drástica no percentual de germinação. Um efeito de retardo de germinação não foi observado e em somente uma das coletas (Coleta 3) o extrato de *Canoparmelia texana* causou redução significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). Nessa coleta, o percentual de germinação de sementes de milho tratadas com *Canoparmelia texana* foi de 69,4% contra 86,4% do controle (Tabela 1).

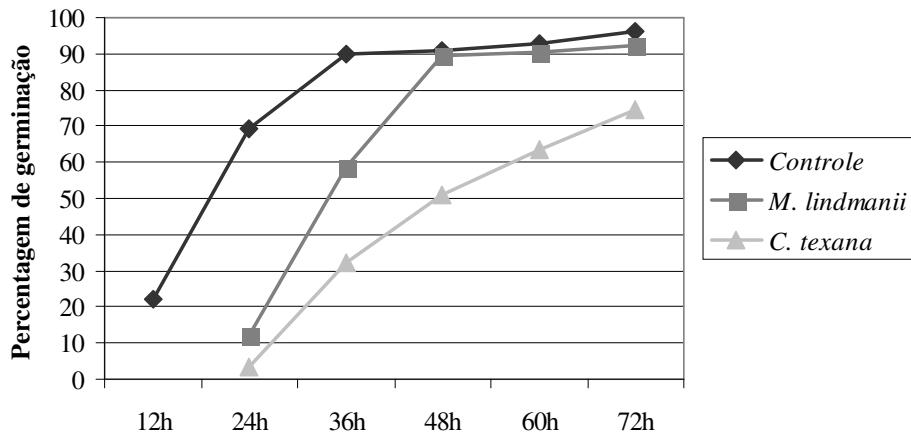


FIGURA 5 Percentual de germinação de sementes de alfaca após exposição aos extratos aquosos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana* provenientes da Coleta 1 (janeiro de 2002).

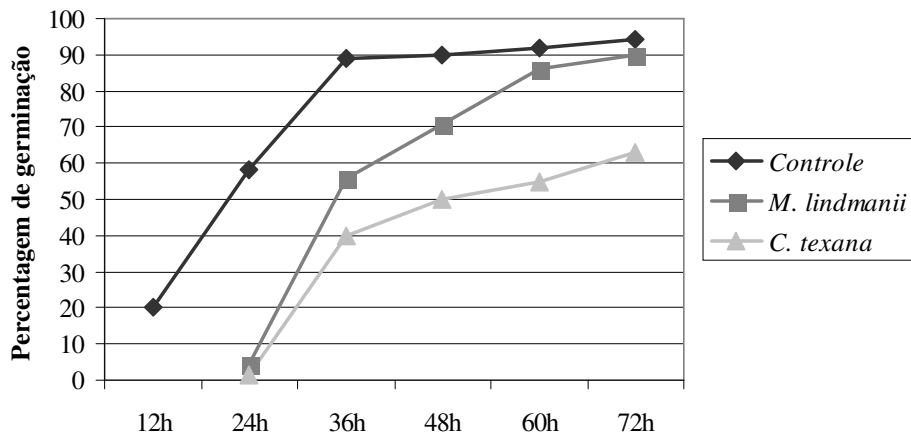


FIGURA 6 Percentual de germinação de sementes de alfaca após exposição aos extratos aquosos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana* provenientes da Coleta 3 (janeiro de 2003).

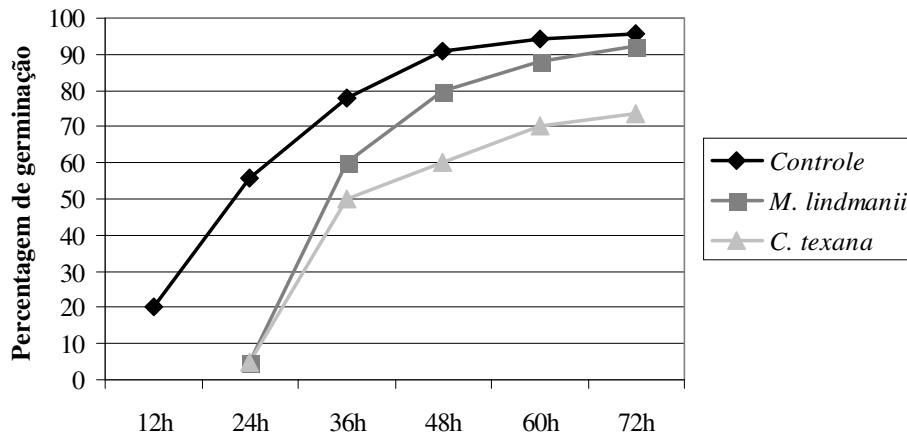


FIGURA 7 Percentual de germinação de sementes de alface após exposição aos extratos aquosos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana* provenientes da Coleta 2 (agosto de 2002).

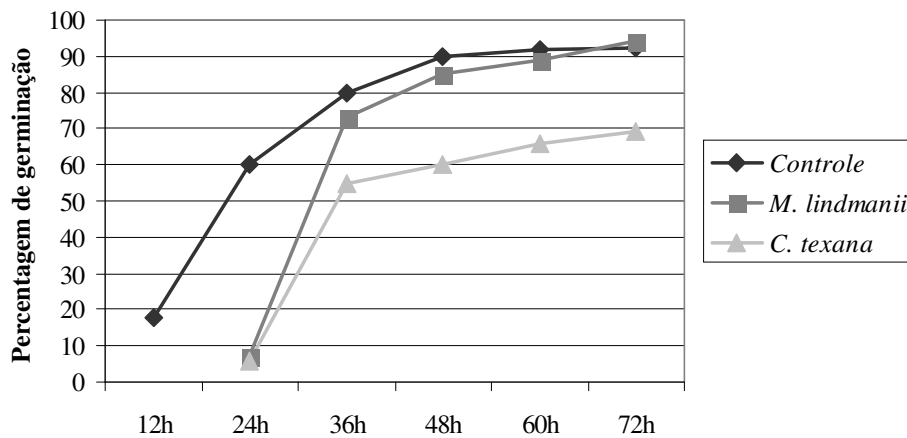


FIGURA 8 Percentual de germinação de sementes de alface após a exposição aos extratos aquosos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana* provenientes da Coleta 4 (agosto de 2003).

Os resultados obtidos na análise do crescimento radicular em 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas após a exposição aos extratos em sementes de alface, revelaram que *Myelochroa lindmanii* causou um retardo na velocidade de crescimento da raiz. O crescimento radicular final (72h), mostrou-se diferente do controle em todas as quatro coletas, embora o efeito seja mais drástico nas coletas realizadas em períodos chuvosos (Tabelas 1 e 2). Esta espécie, embora não afete o percentual final de germinação, retarda o início da germinação e a velocidade de crescimento da raiz. O comportamento de *Myelochroa lindmanii* sobre raízes de milho também foi similar, com as maiores inibições causadas em épocas chuvosas (Tabelas 1 e 3).

Canoparmelia texana, por outro lado, reduziu o crescimento radicular em alface apenas nos tratamentos provenientes de coletas de épocas chuvosas (Tabelas 1 e 4). Esta espécie pode, então, além de afetar o percentual final de germinação, causar um retardo no início da germinação e velocidade de crescimento da raiz. Um efeito de *Canoparmelia texana* sobre raízes de milho, estatisticamente diferente do controle, não foi observado (Tabela 1).

TABELA 2 Crescimento radicular (cm) em sementes de alface (*Lactuca sativa*) após 12, 24, 36, 48, 60 e 72h de exposição ao extrato aquoso de *Myelochroa lindmanii* proveniente de coletas em períodos chuvosos.

Tratamentos	Tempos de exposição					
	12h	24h	36h	48h	60h	72h
Controle – Coleta 1	0,54	1,10	1,56	1,89	2,40	2,89
<i>M. lindmanii</i> – Coleta – 1	0	0,31	0,45	0,49	0,49	0,55
Controle – Coleta 3	0,64	0,98	1,71	2,30	2,60	2,74
<i>M. lindmanii</i> – Coleta 3	0	0,11	0,18	0,23	0,30	0,38

TABELA 3 Crescimento radicular (cm) em sementes de milho (*Zea mays*) após 12, 24, 36, 48, 60 e 72h de exposição ao extrato aquoso de *Myelochroa lindmanii* proveniente de coletas em períodos chuvosos.

Tratamentos	Tempos de exposição					
	12h	24h	36h	48h	60h	72h
Controle – Coleta 1	0	0	1,2	4,5	6,7	7,8
<i>M. lindmanii</i> – Coleta – 1	0	0	0,5	2,3	3,6	4,1
Controle – Coleta 3	0	0	1,2	5,1	7,6	8,2
<i>M. lindmanii</i> – Coleta 3	0	0	0,2	2,1	2,9	3,9

TABELA 4 Crescimento radicular (cm) em sementes de alface (*Lactuca sativa*) após 12, 24, 36, 48, 60 e 72h de exposição ao extrato aquoso de *Canoparmelia texana* proveniente de coletas em períodos chuvosos.

Tratamentos	Tempos de exposição					
	12h	24h	36h	48h	60h	72h
Controle – Coleta 1	0	1,10	1,56	1,89	2,40	2,89
<i>C. texanai</i> – Coleta – 1	0	0,23	0,35	0,67	0,78	0,81
Controle – Coleta 3	0	0,98	1,71	2,30	2,60	2,74
<i>C. texana</i> – Coleta 3	0	0,21	0,35	0,43	0,67	0,75

Além disso, foi possível observar que, paralelo a inibição do crescimento radicular, existiam ainda alterações morfológicas nas raízes de alface, fato não evidenciado nas raízes de milho. Em decorrência disso decidiu-se investigar mais detalhadamente essas alterações por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os tratamentos com ambas as espécies causaram aumento da densidade de pêlos absorventes, aparecimento de uma constrição separando a zona pilífera do ápice da raiz e alterações na morfologia da coifa (Figuras 9, 10 e 11).

Em raízes obtidas do tratamento com *Canoparmelia texana* (Figura 10) foi observado aumento da densidade de pelos absorventes, constrição separando a zona pilífera do ápice, morte de células apicais e desaparecimento da coifa.

Em raízes obtidas do tratamento com *Myelochroa lindmanii* (Figura 11), foi observado aumento da densidade de pêlos absorventes, constrição separando a zona pilífera do ápice e redução da coifa.

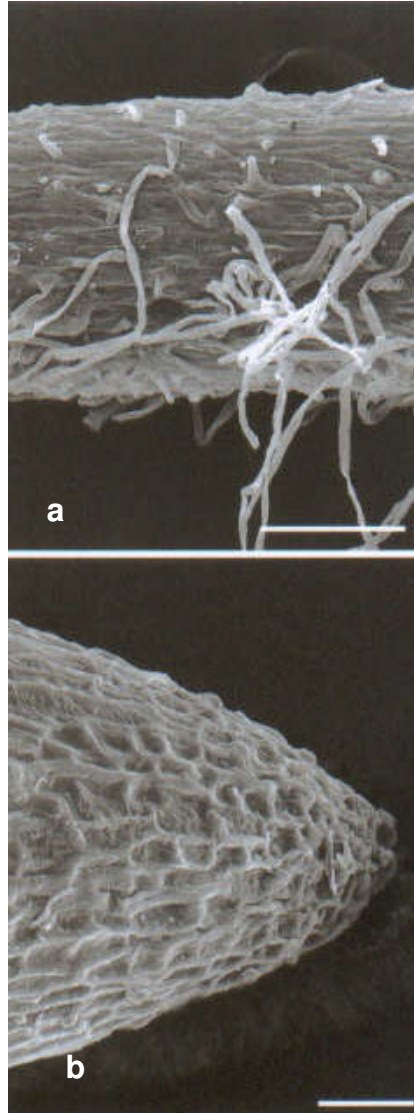


FIGURA 9 Fotomicrografias (MEV) das raízes controle de alface. a - zona pilífera; b - ápice radicular. Barra: 100 μ M.

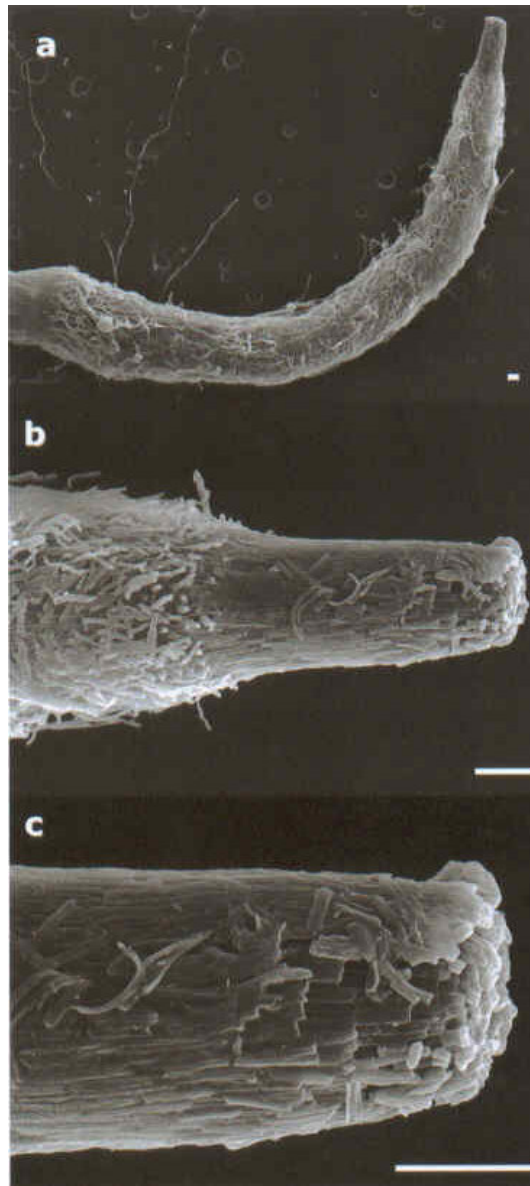


FIGURA 10 Fotomicrografias (MEV) das alterações micromorfológicas em raízes de alfaca induzidas pelo extrato aquoso de *Canoparmelia texana*. a - vista geral da raiz; b - detalhe a partir da zona pilífera; c - detalhe do ápice radicular. Barra: 100 μ M.

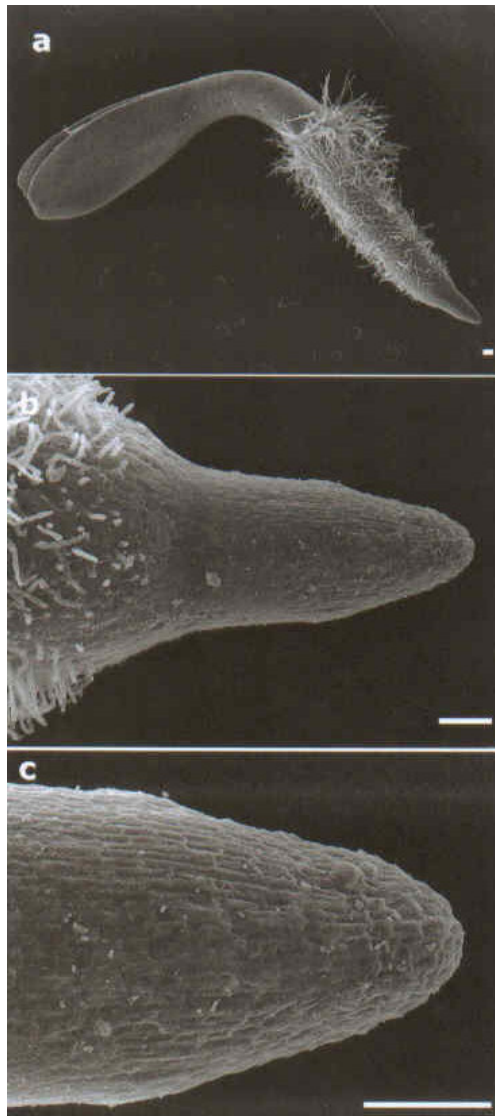


FIGURA 11 Fotomicrografias (MEV) das alterações micromorfológicas em raízes de alfaca induzidas pelo extrato aquoso de *Myelochroa lindmanii*. a - vista geral de uma plântula; b- detalhe a partir da zona pilífera; c – detalhe do ápice radicular. Barra: 100 μ M.

4.2 Análise citogenética após exposição aos extratos aquosos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana*

Com o objetivo de investigar o mecanismo envolvido na redução do crescimento radicular e nas alterações morfológicas radiculares, procedeu-se a análise citogenética.

Os resultados de índice mitótico e metafásico em alface e milho são mostrados nas Figuras 12 a 15.

O extrato de *Myelochroa lindmanii*, tanto em alface quanto em milho, causou um aumento do índice mitótico, explicado por um aumento no número de metáfases acumuladas na lâmina. Esta observação foi particularmente importante nas coletas realizadas em períodos chuvosos. Diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,05$) foram observadas tanto para índice mitótico quanto metafásico em alface, nas coletas 1 e 3. Em milho, esses efeitos foram evidenciados somente na coleta 3, mostrando diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). Mais uma vez, assim como na análise do crescimento radicular, a coleta realizada em janeiro de 2003 (Coleta 3) mostrou uma maior influência.

Ao contrário de *Myelochroa lindmanii*, *Canoparmelia texana* provocou redução do índice mitótico, sem qualquer interferência no índice metafásico. Diferenças significativas ($p < 0,05$) para o índice mitótico foram observadas na coleta 3 em alface e em todas as coletas em milho, evidenciando que o milho mostrou-se mais sensível ao extrato de *Canoparmelia texana*.

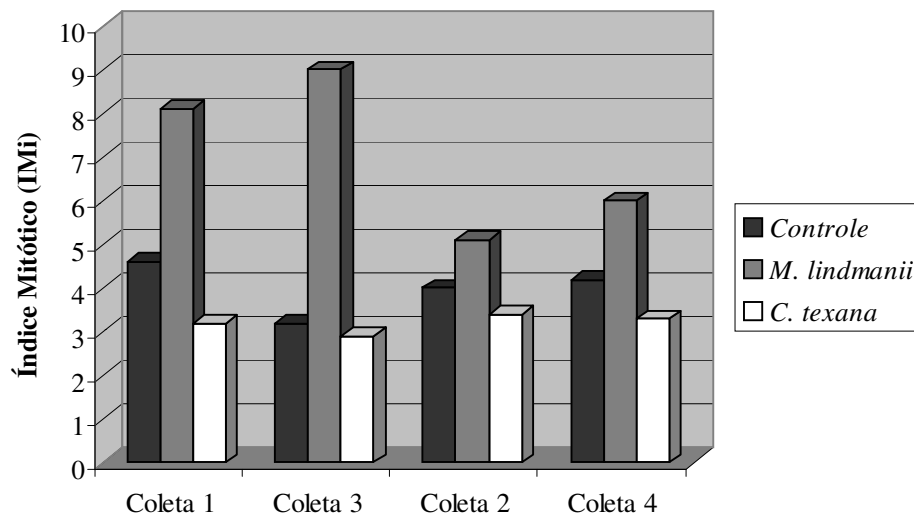


FIGURA 12 Índice mitótico (IMi) em meristemas radiculares de *Lactuca sativa* nas quatro coletas após tratamento com os extratos aquosos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana*.

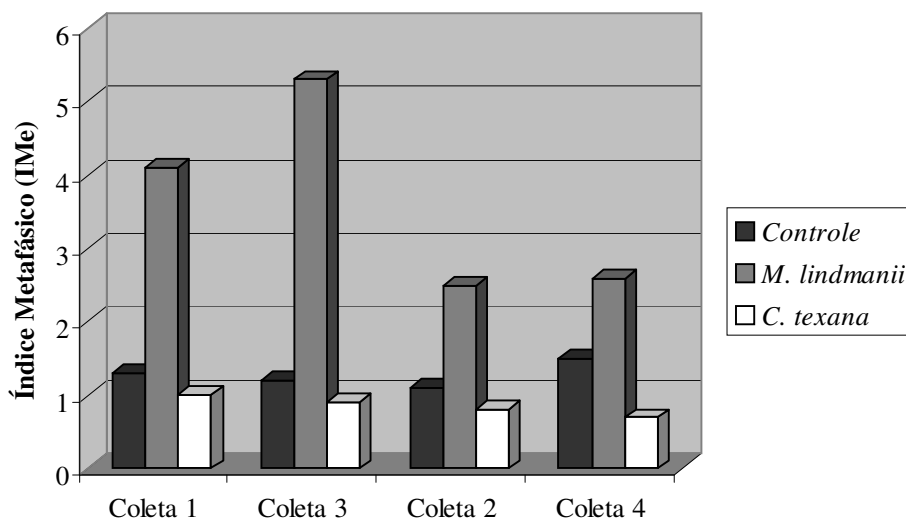


FIGURA 13 Índice metafásico (IME) em meristemas radiculares de *Lactuca sativa* nas quatro coletas após tratamento com os extratos aquosos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana*.

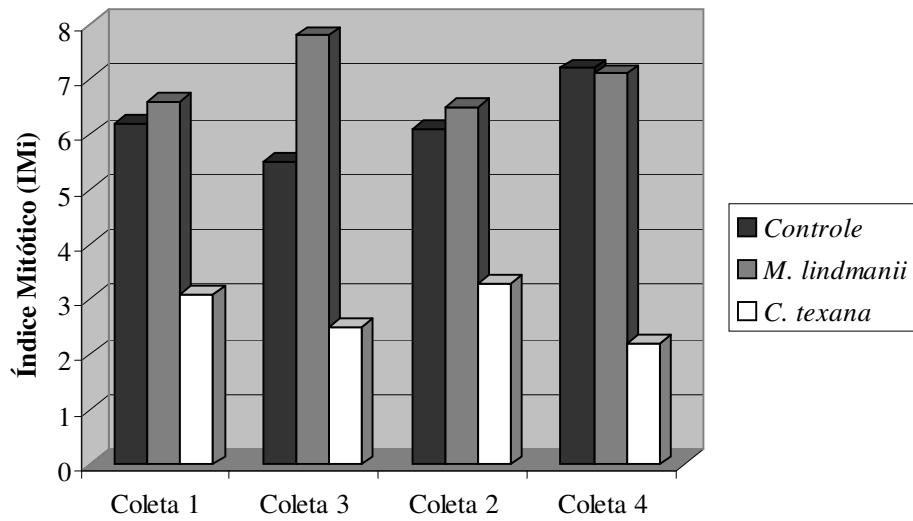


FIGURA 14 Índice mitótico (IMi) em meristemas radiculares de *Zea mays* nas quatro coletas após tratamento com os extratos aquosos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana*.

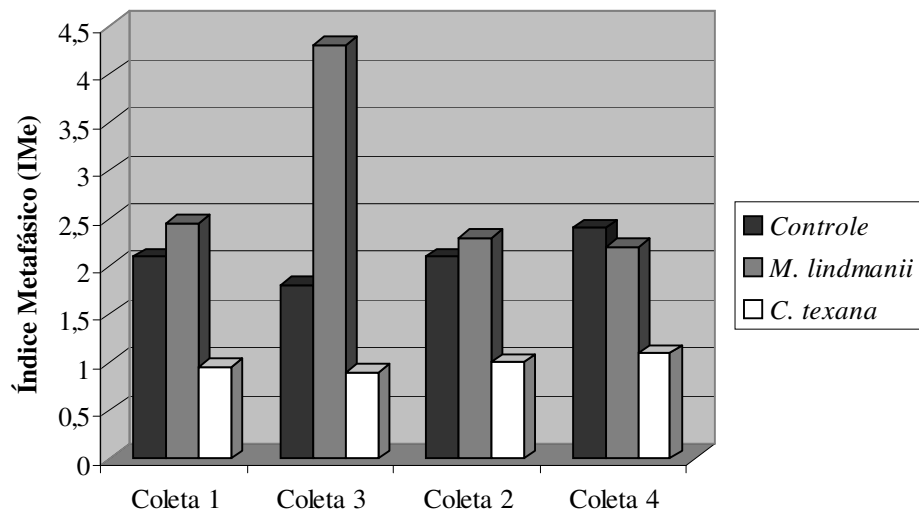


FIGURA 15 Índice metafásico (IMe) em meristemas radiculares de *Zea mays* nas quatro coletas após tratamento com os extratos aquosos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana*.

Os resultados de alterações citogenéticas causadas pelos extratos aquosos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana* em células meristemáticas de alface e milho são mostradas nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. As alterações citogenéticas observadas em células meristemáticas de alface e milho são mostradas nas Figuras 16 e 17 respectivamente.

Ambas as espécies possuem a capacidade de induzir alterações tanto citológicas quanto cromossômicas.

Em alface, *Myelochroa lindmanii*, induziu um aumento significativo do número de alterações citogenéticas em relação ao controle para todas as variáveis analisadas, exceto para fragmentos cromossômicos ($p < 0,05$). Esse efeito foi mais evidente particularmente nas coletas realizadas nos períodos chuvosos. Os efeitos mais evidentes desta espécie sobre alface manifestaram-se por meio do aumento do número de c-metáfases, duplicação cromossômica e morte celular. Na terceira coleta, realizada em janeiro de 2003, foi possível verificar um aumento de 4,2X na percentagem de c-metáfases, de 2,8X na percentagem de duplicação cromossômica e 10,7X na percentagem de morte celular, quando comparado ao controle (Figura 18).

Aumento da ocorrência de cromossomos com migração tardia, cromossomos pegajosos e de pontes em anáfase/telófase também foram observados para as coletas de períodos chuvosos, sempre mostrando diferenças significativas em relação ao controle. Este efeito foi mais evidente nos tratamentos provenientes da Coleta-3 (janeiro de 2003).

Já em células meristemáticas de milho, o efeito de *Myelochroa lindmanii* não foi tão evidente, embora diferenças estatísticas em relação ao controle tenham sido observadas para todas as variáveis exceto para cromossomos pegajosos (Tabela 6).

TABELA 5 Percentagens de alterações citogenéticas em células meristemáticas de alface (*Lactuca sativa*) após tratamento com os extratos aquosos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana*.

Tratamentos	Cromossomos pegajosos	Pontes em anáfase/telófase	Fragmentos cromossômicos	Migração tardia	Duplicação cromossômica	Morte celular	c-metáfases
Cont/Jan02	4,8 a	0,6 a	0,11 a	1,2 a	0 a	2,0 a	6,2 a
Cont/Jan03	5,4 a	0,8 a	0,15 a	0,9 a	0 a	3,1 a	6,9 a
Cont/Ag02	7,0 a	1,0 a	0,09 a	1,4 a	0 a	2,4 a	7,3 a
Cont/Ag03	6,1 a	1,2 a	0,03 a	1,7 b	0 a	2,7 a	7,4 a
<i>M.lin</i> /Jan02	6,6 a	0,8 a	0,15 a	3,3 c	1,8 b	21,7 c	24,3 c
<i>M.lin</i> /Jan03	7,2 b	2,5 b	0,12 a	3,5 c	2,8 c	33,1 e	29,1 c
<i>M.lin</i> /Ag02	6,9 a	2,0 a	0,11 a	1,5 a	2,0 b	9,5 b	9,3 a
<i>M.lin</i> /Ag03	6,3 a	1,7 a	0,18 a	1,1 a	1,1 b	13,1 b	12,1 b
<i>C.tex</i> /Jan02	12,1 c	1,3 a	0,11 a	1,4 a	0 a	20,9 c	9,7 a
<i>C.tex</i> /Jan03	13,4 c	1,3 a	0,02 a	1,7 b	0 a	18,3 c	7,8 a
<i>C.tex</i> /Ag02	9,8 b	1,7 a	0,04 a	1,6 a	0 a	24,6 d	6,3 a
<i>C.tex</i> /Ag03	10,2 b	1,6 a	0,14 a	0,5 a	0 a	29,7 d	5,9 a

* Cont - Controle; *M. lin* - *Myelochroa lindmanii*; *C. tex* - *Canoparmelia texana*; Jan02 - Janeiro de 2002; Jan03 - Janeiro de 2003; Ag02 - Agosto de 2002; Ag03 - Agosto de 2003.

** As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$).

TABELA 6 Percentagens de alterações citogenéticas em células meristemáticas de milho (*Zea mays*) após tratamento com os extratos aquosos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana*.

Tratamentos	Cromossomos pegajosos	Pontes em anáfase/telófase	Fragmentos cromossômicos	Migração.		Morte celular	c-metáfases
				tardeia	tardia		
Cont/Jan02	2,1 a	0,7 a	0,13 a	1,2 a	3,1 a	4,3 a	
Cont/Jan03	1,9 a	0,9 a	0,17 a	1,1 a	2,3 a	4,2 a	
Cont/Ag02	2,3 a	1,1 a	0,15 a	0,9 a	2,1 a	3,2 a	
Cont/Ag03	1,3 a	1,3 a	0,06 a	0,8 a	2,0 a	3,6 a	
<i>M lin</i> /Jan02	1,7 a	4,9 b	1,17 b	1,3 a	21,2 c	8,3 b	
<i>M lin</i> /Jan03	2,7 a	6,4 c	1,34 b	1,6 a	19,5 c	9,7 c	
<i>M lin</i> /Ag02	2,2 a	3,2 b	0,78 a	1,8 b	14,2 b	6,2 b	
<i>M lin</i> /Ag03	0,8 a	3,6 b	0,65 a	0,6 a	17,5 c	6,7 b	
<i>C tex</i> /Jan02	3,4 a	1,4 a	0,15 a	0,7 a	17,6 c	5,7 a	
<i>C tex</i> /Jan03	3,7 a	1,7 a	0,08 a	0,6 a	15,7 b	4,2 a	
<i>C tex</i> /Ag02	2,7 a	1,1 a	0,08 a	0,9 a	9,8 b	3,1 a	
<i>C tex</i> /Ag03	3,4 a	1,3 a	0,04 a	0,7 a	9,4 b	2,6 a	

* Cont - Controle; *M. lin* - *Myelochroa lindmanii*; *C. tex* - *Canoparmelia texana*; Jan02 - Janeiro de 2002; Jan03 - Janeiro de 2003; Ag02 - Agosto de 2002; Ag03 - Agosto de 2003.

** As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$).

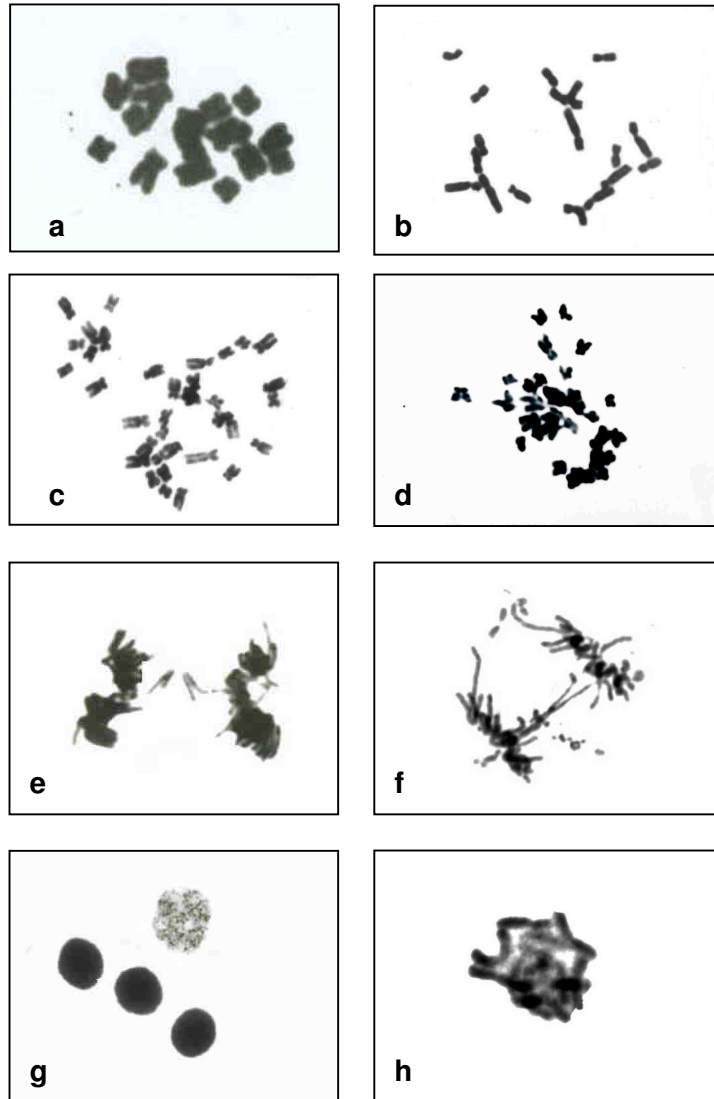


FIGURA 16 Alterações em células meristemáticas de alfaca (a e b) c-metáfase após tratamento com *Myelochroa lindmanii*; (c e d) duplicação cromossômica após tratamento com *Myelochroa lindmanii*; (e) migração tardia após tratamento com *Myelochroa lindmanii*; (f) ponte cromossômica após tratamento com *Myelochroa lindmanii*; (g) morte celular (seta) após tratamento com *Canoparmelia texana*; (h) cromossomos pegajosos após tratamento com *Canoparmelia texana*.

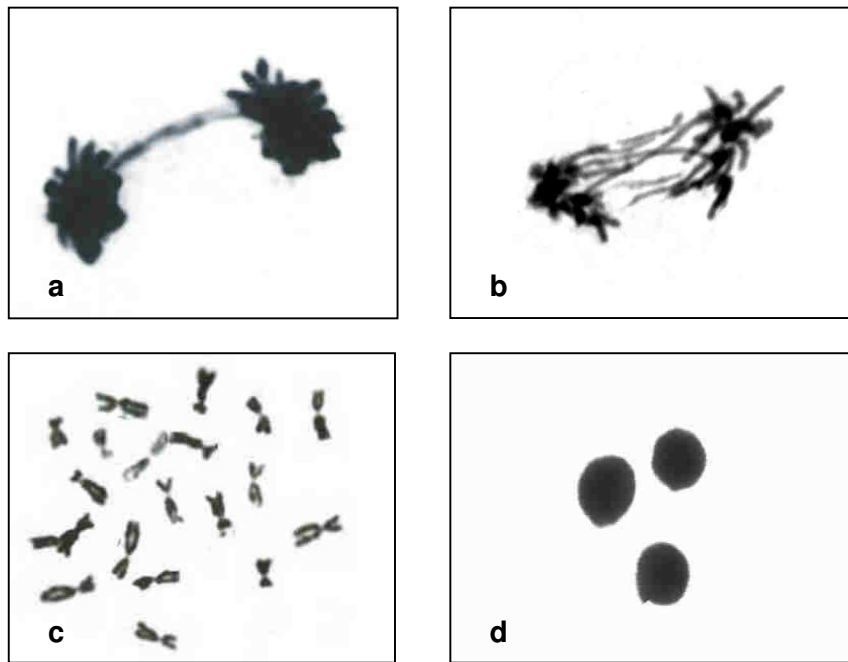


FIGURA 17 Alterações em células meristemáticas de milho (a e b) pontes cromossômicas após tratamento com *Myelochroa lindmanii*; (c) c-metáfase após tratamento com *Myelochroa lindmanii*; (d) morte celular após tratamento com *Canoparmelia texana*.

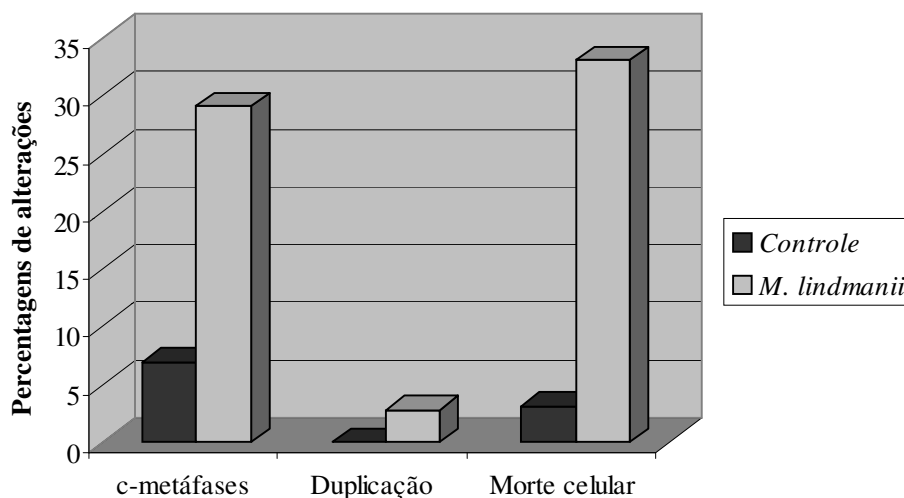


FIGURA 18 Percentagem de c-metáfases, duplicação cromossômica e morte celular em células meristemáticas de alface após tratamento com *Myelochroa lindmanii* proveniente da terceira coleta (Janeiro de 2003).

Duplicação cromossômica não foi observada em células meristemáticas de milho tratadas com *Myelochroa lindmanii*. Assim como em alface, um aumento do número de morte celular e c-metáfases, são efeitos evidentes. Particularmente importante quando se analisa os dados provenientes da citogenética de milho, é o aumento no percentual de anáfases/telófases com pontes cromossômicas. Em todas as coletas, foi possível observar diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 19).

Já para *Canoparmelia texana*, o efeito clastogênico não foi tão drástico quanto para *Myelochria lindmanii*. Diferenças significativas foram observadas em alface para morte celular e cromossomos pegajosos (nas 4 coletas) e migração tardia dos cromossomos (Coleta 3) (Tabela 5). Em milho, diferenças estatísticas foram observadas somente para morte celular (nas 4 coletas) (Tabela 6).

Ao contrário dos tratamentos com *Myelochroa lindmanii*, cromossomos pegajosos em células de milho representam uma importante variável ao se analisar o efeito de *Canoparmelia texana*. Em todas as quatro coletas, foi possível detectar diferenças estatísticas em relação ao controle (Figura 20).

De modo geral, é possível verificar que as coletas em períodos chuvosos causam um efeito maior em alterações citogenéticas, do que as coletas realizadas em períodos secos. Este fato pode ser observado através das porcentagens totais de células alteradas em alface e milho (Tabela 7). Foi possível observar que para ambas as espécies utilizadas como modelo, tanto *Myelochroa lindmanii* quanto *Canoparmelia texana* causaram um aumento do número de células alteradas, principalmente nas coletas dos períodos chuvosos.

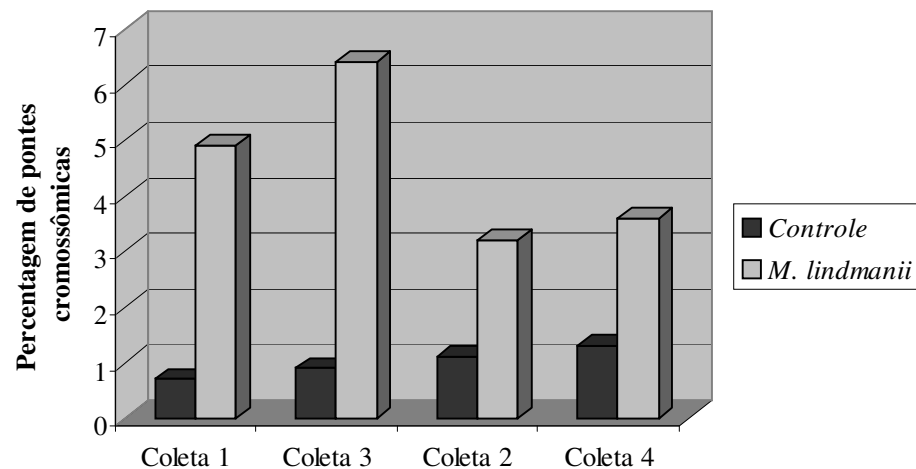


FIGURA 19 Percentagem de anáfases/telófases com pontes cromossômicas em células meristemáticas de milho após tratamento com *Myelochroa lindmanii*.

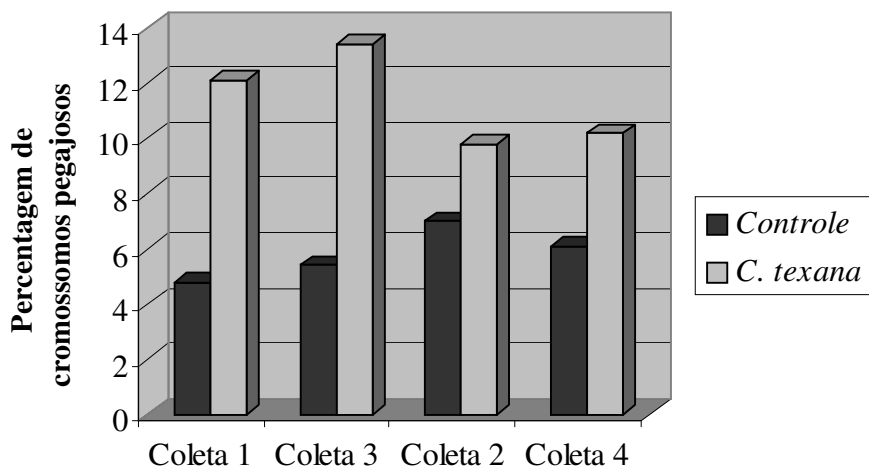


FIGURA 20 Percentagem de cromossomos pegajosos em células meristemáticas de alface após tratamento com *Canoparmelia texana*.

TABELA 7 Percentagem de células alteradas em alface e milho após tratamento com os extratos aquosos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana* provenientes das quatro coletas.

		% de alterações	
		Alface	Milho
Coleta 1 (jan 2002)	Controle	7,3	5,4
	<i>M. lindmanii</i>	42,4	27,3
	<i>C. texana</i>	34,3	25,4
Coleta 3 (jan 2003)	Controle	9,7	6,3
	<i>M. lindmanii</i>	65,4	31,3
	<i>C. texana</i>	39,3	20,4
Coleta 2 (ago 2002)	Controle	10,1	6,4
	<i>M. lindmanii</i>	29,3	20,2
	<i>C. texana</i>	34,5	13,4
Coleta 4 (ago 2003)	Controle	9,8	5,2
	<i>M. lindmanii</i>	38,4	24,3
	<i>C. texana</i>	32,3	13,2

4.3 Percentagem de germinação, crescimento radicular e microscopia eletrônica de varredura após exposição aos extratos aquosos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa*

Os resultados obtidos pela análise do percentual de germinação e crescimento radicular em alface e milho são mostrados na Tabela 8.

Ambas as espécies, *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa*, possuem atividade interferindo na percentagem de germinação e no crescimento radicular tanto em alface quanto em milho.

Verificou-se que o percentual de germinação em sementes de alface foi reduzido drasticamente após tratamento, tanto com *Gleicheniella pectinata* quanto *Dicranopteris flexuosa*, sendo possível observar diferenças significativas em relação ao controle em todas as coletas. Foi possível observar ainda que a inibição é maior nos tratamentos provenientes de coletas em períodos chuvosos.

Em média, as coletas realizadas nesses períodos reduzem em 64,6% o percentual de germinação, contra uma redução de 44,5% nos tratamentos provenientes de coletas em períodos secos (Tabela 8).

A análise do crescimento radicular em alface revelou que após a exposição aos extratos de ambas as espécies, ocorreu redução uniforme, não havendo diferença entre as épocas de coleta.

Em milho, o efeito sobre o percentual de germinação dos extratos tanto de *Gleicheniella pectinata* quanto de *Dicranopteris flexuosa*, manifestou-se somente na Coleta 3. Nessa coleta, foi possível observar uma redução no percentual de germinação de 19,7% para o tratamento com *Gleicheniella pectinata* e 21% para o tratamento com *Dicranopteris flexuosa*.

Os resultados de crescimento radicular, em milho, foram similares aos encontrados em raízes de alface. Todos os tratamentos de ambas as espécies foram estatisticamente diferentes do controle, não sendo possível evidenciar diferença entre as épocas de coleta.

Os resultados obtidos na análise do percentual de germinação em 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas após exposição das sementes de alface aos extratos

provenientes das coletas em períodos chuvosos (janeiro de 2002 e 2003) e para as coletas em períodos secos (agosto de 2002 e 2003) são mostradas nas Figuras 21, 22, 23 e 24, respectivamente. Tanto *Gleicheniella pectinata* quanto *Dicranopteris flexuosa*, além de causar uma diminuição no percentual de germinação final em 72 horas, provocaram acentuado retardo no início da germinação. Enquanto no controle, as sementes de alface apresentaram, em média, 20% de germinação já em 12 horas de tratamento, somente em 36 horas foi possível observar, em média, 15% das sementes germinadas, após tratamento com *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa*.

Nota-se que em 12 e 24 horas de tratamento nenhuma das raízes de alface ainda tinham germinado.

TABELA 8 Percentual de germinação e crescimento radicular (cm) após 72h em sementes de alface (*Lactuca sativa*) e milho (*Zea mays*) após tratamento com os extratos aquosos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa*.

Tratamentos	Percentual de germinação		Crescimento radicular (cm)	
	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Zea mays</i>
Cont/jan02	96,2 a	87,3 a	2,89 a	7,8 a
Cont/jan03	94,3 a	86,4 a	2,74 a	8,2 a
Cont/ag02	95,7 a	79,3 a	1,98 a	6,9 a
Cont/ag03	92,4 a	81,2 a	2,31 a	10,1 a
<i>G.pec</i> /jan02	28,9 c	76,3 a	0,67 b	4,5 b
<i>G.pec</i> /jan03	27,5 c	66,7 b	0,56 b	3,5 b
<i>G.pec</i> /ag02	43,2 b	79,8 a	0,71 b	3,5 b
<i>G.pec</i> /ag03	41,3 b	80,1 a	0,69 b	3,6 b
<i>D.fle</i> /jan02	32,4 c	74,7 a	0,67 b	4,2 b
<i>D.fle</i> /jan03	33,5 c	65,4 b	0,81 b	4,3 b
<i>D.fle</i> /ag02	57,3 b	80,2 a	0,78 b	5,2 b
<i>D.fle</i> /ag03	56,4 b	85,4 a	0,76 b	5,1 b

* Cont – Controle; *G.pec* – *Gleicheniella pectinata*; *D. fle* – *Dicranopteris flexuosa*; jan02 – janeiro de 2002; jan03 – janeiro de 2003; ag02 – agosto de 2002; ag03 – agosto de 2003.

** As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$).

Em milho, somente na Coleta 3 foi possível detectar diferença no percentual final de germinação após 72 horas para ambas as espécies (Tabela 8). Entretanto, nenhum efeito de retardo no início da germinação foi observado. Geralmente, as sementes de milho germinam um pouco mais tarde do que sementes de alface, geralmente por volta de 30 horas. Em todos os tratamentos foi observado este mesmo comportamento.

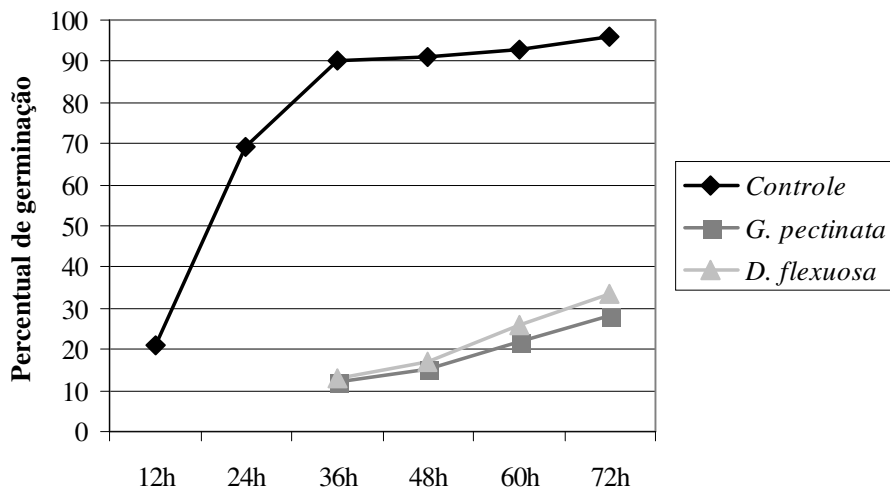


FIGURA 21 Percentual de germinação de sementes de alface após exposição aos extratos aquosos de *Gleicheniella pectinata* e *Canoparmelia texana* provenientes da Coleta 1 (janeiro de 2002).

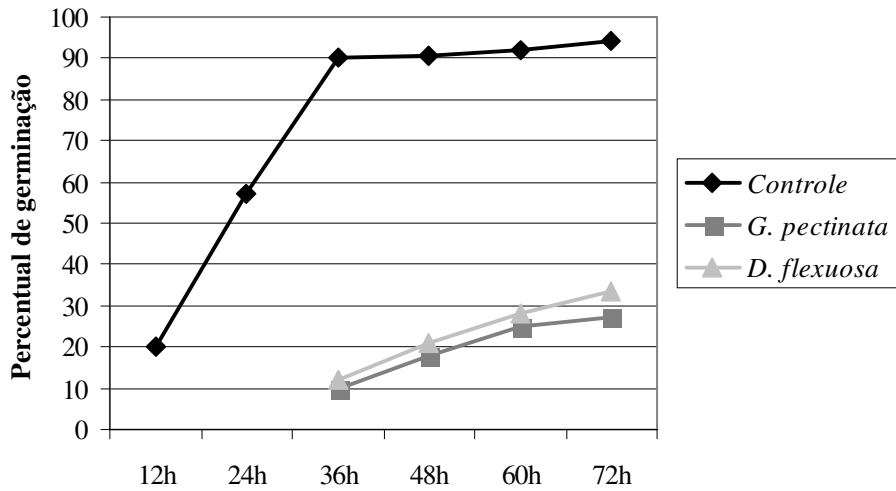


FIGURA 22 Percentual de germinação de sementes alface após exposição aos extratos aquosos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa* provenientes da Coleta 3 (janeiro de 2003).

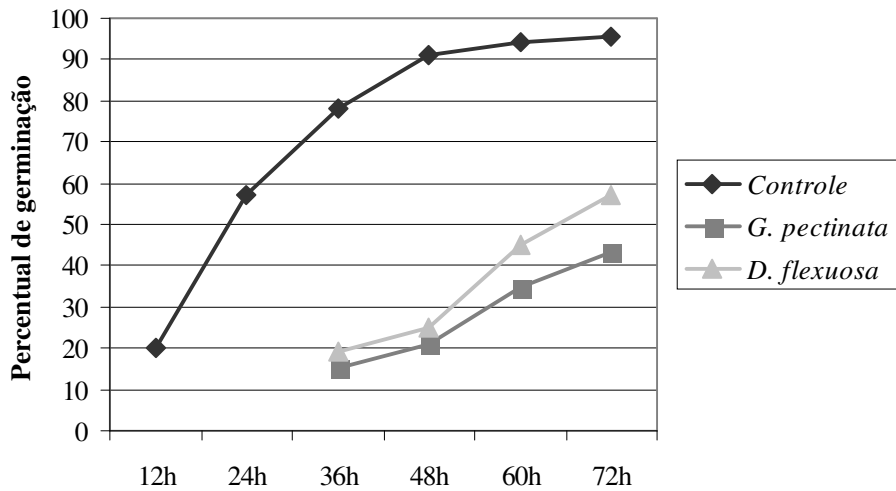


FIGURA 23 Percentual de germinação de sementes de alface após exposição aos extratos aquosos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopeteris flexuosa* provenientes da Coleta 2 (agosto de 2002).

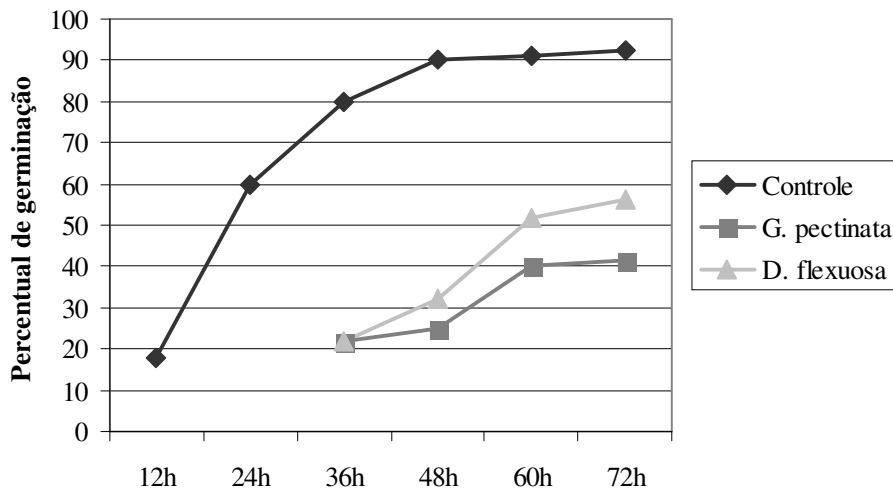


FIGURA 24 Percentual de germinação de sementes de alface após a exposição aos extratos aquosos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa* provenientes da Coleta 4 (Agosto de 2003).

Paralelo ainda à inibição do crescimento radicular, os resultados obtidos em 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas após exposição aos extratos em sementes de alface e milho revelaram que ambas as espécies provocaram ainda um retardo na velocidade de crescimento da raiz (dados não mostrados). Como já demonstrado, tanto em alface quanto em milho os tratamentos com ambas as espécies evidenciaram diferença significativa após 72 horas de exposição em relação ao controle em todas as coletas (Tabela 8).

Foi possível observar ainda que, nas raízes tratadas com os extratos das pteridófitas, paralelamente a inibição do crescimento radicular, ocorreram alterações morfológicas nas raízes de alface, fato não evidenciado nas raízes de milho. Em decorrência disso, decidiu-se investigar mais detalhadamente essas alterações por microscopia eletrônica de varredura. O tratamento com ambas as espécies causaram aumento da densidade de pêlos absorventes, o aparecimento de uma constrição separando a zona pilífera do ápice da raiz e alterações na

morfologia da coifa.

Em raízes obtidas do tratamento com *Gleicheniella pectinata* (Figura 25), foi observado aumento da densidade de pelos absorventes, constrição separando a zona pilífera do ápice e redução da coifa.

Em raízes obtidas do tratamento com *Dicranopteris flexuosa* (Figura 26), foi observado aumento da densidade de pêlos absorventes, constrição separando a zona pilífera do ápice, morte celular e desaparecimento da coifa.

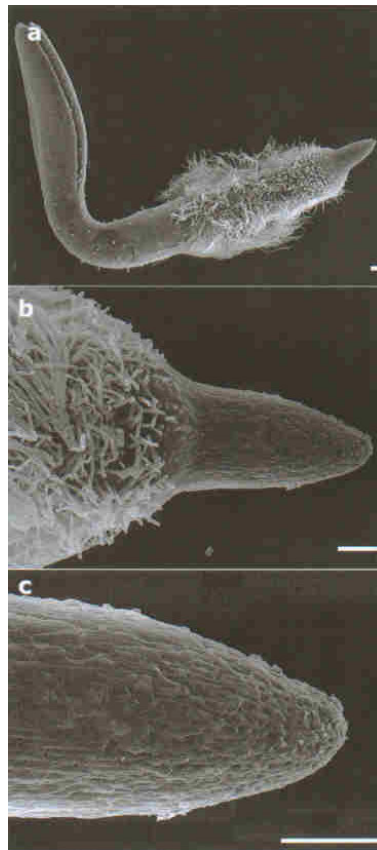


FIGURA 25 Fotomicrografias (MEV) das alterações micromorfológicas em raízes de alfaca induzidas pelo extrato aquoso de *Gleicheniella pectinata*. a - vista geral da raiz; b - detalhe incluindo a zona pilífera e o ápice; c - detalhe do ápice radicular. Escala: 100 μ m

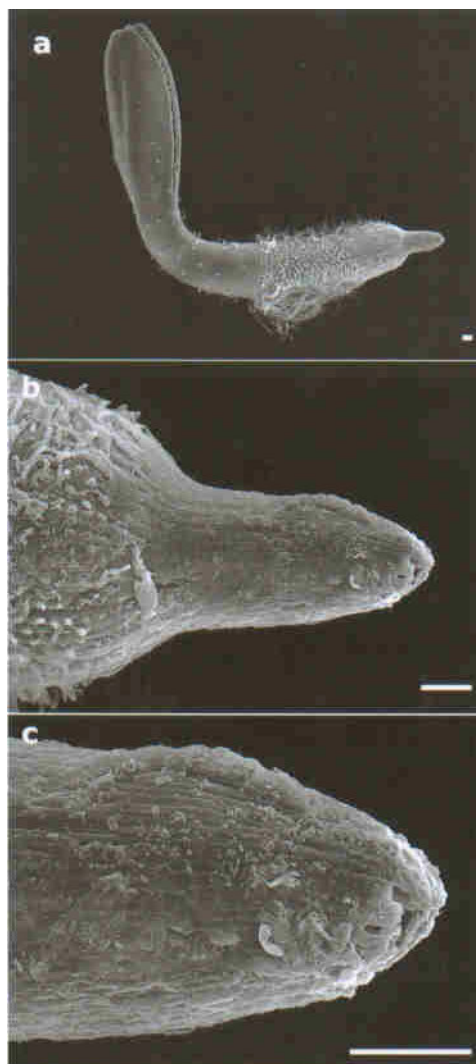


FIGURA 26 Fotomicrografias (MEV) das alterações micromorfológicas em raízes de alfaca induzidas pelo extrato aquoso de *Dicranopteris flexuosa*. a- vista geral da raiz; b- detalhe a partir da zona pilífera; c – detalhe do ápice radicular. Escala: 100 μ m

4.4 Análise citogenética após exposição aos extratos aquosos *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa*

Com o objetivo de investigar o mecanismo envolvido na redução do crescimento radicular e nas alterações morfológicas radiculares, procedeu-se à análise citogenética.

Os resultados de índice mitótico e metafásico em alface e milho podem ser vistos nas Figuras 27 a 30.

Foi possível observar que ambas as espécies possuem atividade antimitótica evidenciada pela redução no índice mitótico e metafásico. Esse efeito foi estatisticamente diferente do controle em todas as coletas, tanto em milho quanto em alface. Adicionalmente, foi possível observar que a maior inibição foi sempre observada em tratamentos provenientes de coletas em épocas chuvosas (janeiro de 2002 e 2003).

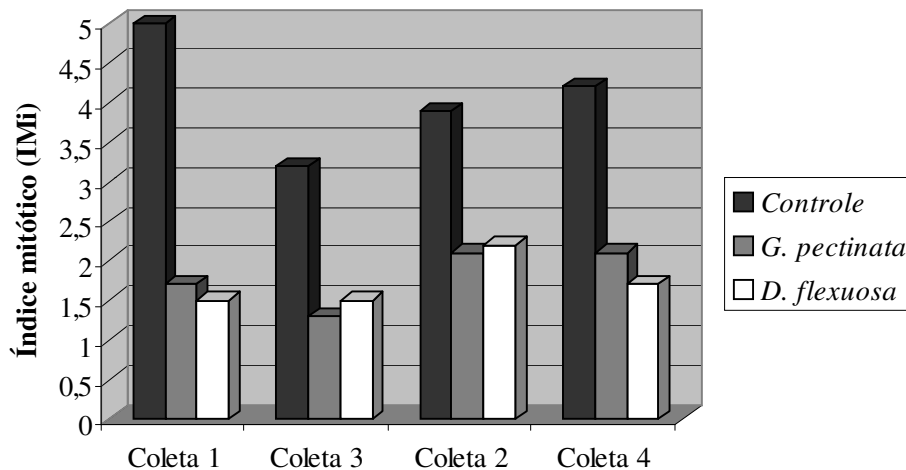


FIGURA 27 Índice mitótico (IMi) em meristemas radiculares de *Lactuca sativa* nas quatro coletas após tratamento com os extratos aquosos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa*.

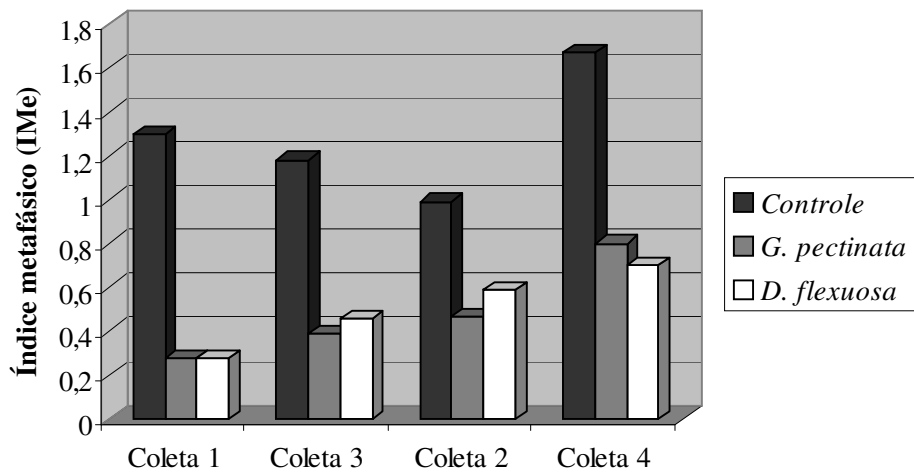


FIGURA 28 Índice metafásico (IME) em meristemas radiculares de *Lactuca sativa* nas quatro coletas após tratamento com os extratos aquosos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa*.

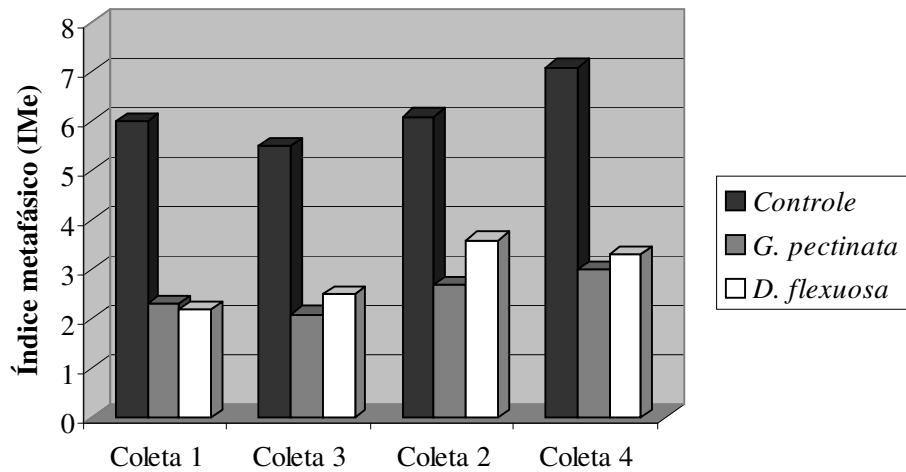


FIGURA 29 Índice mitótico (IMi) em meristemas radiculares de *Zea mays* nas quatro coletas após tratamento com os extratos aquosos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa*.

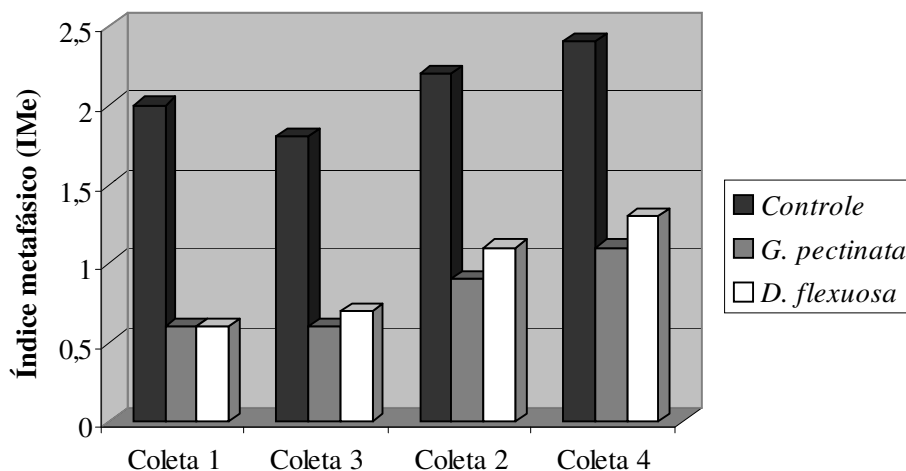


FIGURA 30 Índice metafásico em células meristemáticas de *Zea mays* nas quatro coletas após tratamento com os extratos aquosos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa*.

Os resultados de alterações citogenéticas causadas pelos extratos aquosos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa* em células meristemáticas de alface e milho são mostrados nas Tabelas 9 e 10 respectivamente. As alterações citogenéticas em células meristemáticas de alface e milho são mostradas na Figura 31.

Em alface, foi possível observar que *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa* causaram aumento do número de alterações, significativamente diferente em relação ao controle em somente duas variáveis (cromossomos pegajosos e morte celular) (Tabela 9). Nota-se que o aumento de morte celular foi mais evidente em tratamentos provenientes de épocas chuvosas. Nesta época, em média, *Gleicheniella pectinata* provocou 47% e *Dicranopteris flexuosa* 52,9% de morte celular contra 2,5% do controle. Particularmente importante também foi a variável cromossomos pegajosos, sendo possível ainda perceber aumento do percentual de alterações em

tratamentos provenientes de épocas chuvosas. Já em milho, essa variável não mostrou qualquer diferença estatística para o controle.

Por outro lado, a variável ponte cromossômica para a qual não havia sido possível detectar qualquer diferença em relação ao controle em alface mostrou diferença significativa em milho na terceira coleta (janeiro de 2003). De forma análoga aos resultados encontrados em alface, também em milho foi possível encontrar diferenças significativas para a variável morte celular. Em células meristemáticas de milho, *Dicranopteris flexuosa* parece causar um maior número de morte celular do que *Gleicheniella pectinata*. Esse efeito pode ser observado obtendo-se as médias de morte celular a partir das quatro coletas (25,9 % para *Dicranopteris flexuosa* contra 17,4% para *Gleicheniella pectinata*). Entretanto, em tratamentos provenientes de épocas chuvosas, o comportamento de ambas as espécies foi similar.

De modo geral, as coletas em períodos chuvosos causaram um efeito maior em alterações citogenéticas do que coletas realizadas em períodos secos.

Este fato pode ser observado pelas porcentagens totais de células alteradas em alface e milho (Tabela 11). É possível observar que para ambas as espécies utilizadas como modelo, tanto *Gleicheniella pectinata* quanto *Dicranopteris flexuosa* causaram um aumento do número de células alteradas, principalmente nas coletas 1 e 3 (Períodos chuvosos).

TABELA 9 Percentagens de alterações citogenéticas em células meristemáticas de alface (*Lactuca sativa*) após tratamento com os extratos aquosos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa*.

Tratamentos	Cromossomos pegajosos	Pontes em anáfase/telófase	Fragmentos cromossômicos	Migração tardia	Morte celular	c-metáfases
Cont/Jan02	4,8 a	0,6 a	0,11 a	1,2 a	2,0 a	6,2 a
Cont/Jan03	5,4 a	0,8 a	0,15 a	0,9 a	3,1 a	6,9 a
Cont/Ago02	6,3 a	1,0 a	0,09 a	1,4 a	2,4 a	7,3 a
Cont/Ago03	6,1 a	1,2 a	0,03 a	1,4 a	2,7 a	7,4 a
<i>G.pec</i> /Jan02	28,1 c	0,8 a	0,08 a	1,2 a	48,3 c	4,3 a
<i>G.pec</i> /Jan03	27,8 c	0,7 a	0,07 a	1,5 a	45,7 c	5,4 a
<i>G.pec</i> /Ago02	14,5 b	1,1 a	0,05 a	1,4 a	32,1 b	6,1 a
<i>G.pec</i> /Ago03	13,5 b	0,3 a	0,01 a	0,9 a	33,4 b	4,3 a
<i>D.fle</i> /Jan02	28,9 c	0,6 a	0,02 a	0,8 a	53,4 c	5,7 a
<i>D.fle</i> /Jan03	31,5 c	0,5 a	0,05 a	1,2 a	52,5 c	4,5 a
<i>D.fle</i> /Ago02	13,4 b	1,2 a	0,06 a	1,3 a	34,6 b	6,1 a
<i>D.fle</i> /Ago03	15,6 b	0,4 a	0,05 a	1,1 a	39,8 b	5,6 a

* Cont – Controle; *G. pec* – *Gleicheniella pectinata*; *D. fle* – *Dicranopteris flexuosa*; Jan02 – Janeiro de 2002; Jan03 – Janeiro de 2003; Ago02 – Agosto de 2002; Ago03 – Agosto de 2003.

** As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$).

TABELA 10 Percentagens de alterações citogenéticas em células meristemáticas de milho (*Zea mays*) após tratamento com os extratos aquosos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa*.

Tratamentos	Cromossomos		Pontes em		Fragmentos		Migração		Morte		c-metáfases
	pegajosos	anáfase/telófase	anáfase/telófase	anáfase/telófase	cromossômicos	tardia	celular	celular			
Cont/Jan02	2,1 a	0,7 a	0,13 a	1,2 a	3,1 a	4,3 a					
Cont/Jan03	1,9 a	0,9 a	0,17 a	1,1 a	2,3 a	4,2 a					
Cont/Ago02	2,3 a	1,1 a	0,15 a	0,9 a	2,1 a	3,2 a					
Cont/Ago03	1,3 a	1,3 a	0,06 a	0,8 a	2,0 a	3,6 a					
<i>G.pec</i> :Jan02	1,4 a	1,6 a	0,08 a	1,2 a	23,4 c	3,4 a					
<i>G.pec</i> :Jan03	1,5 a	2,8 b	0,05 a	1,3 a	22,5 c	5,2 a					
<i>G.pec</i> :Ago02	1,7 a	1,4 a	0,04 a	0,9 a	12,7 b	2,6 a					
<i>G.pec</i> :Ago03	2,1 a	1,3 a	0,05 a	0,6 a	11,2 b	2,7 a					
<i>D.fle</i> :Jan02	2,3 a	0,9 a	0,05 a	1,2 a	23,7 c	2,7 a					
<i>D.fle</i> :Jan03	2,5 a	0,7 a	0,05 a	1,4 a	25,6 c	3,4 a					
<i>D.fle</i> :Jan02	2,3 a	1,2 a	0,07 a	1,1 a	27,6 c	3,6 a					
<i>D.fle</i> :Jan03	1,8 a	1,5 a	0,04 a	1,2 a	26,8 c	4,1 a					

* Cont – Controle; *G. pec* – *Gleicheniella pectinata*; *D. fle* – *Dicranopteris flexuosa*; Jan02 – Janeiro de 2002; Jan03 – Janeiro de 2003; Ago02 – Agosto de 2002; Ago03 – Agosto de 2003.

** As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$).

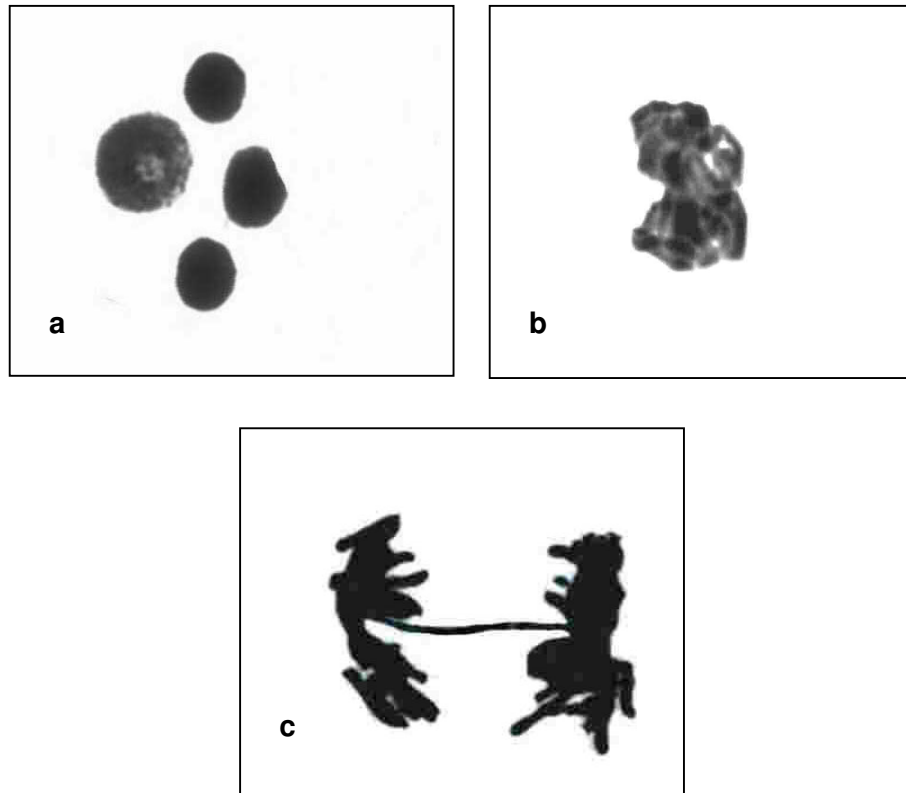


FIGURA 31 Alterações em células meristemáticas de alfaca e milho. (a) Morte celular em alfaca após tratamento com *Dicranopteris flexuosa*; (b) Cromossomos pegajosos em alfaca após tratamento com *Gleicheniella pectinata*; (c) Ponte cromossômica em milho após tratamento com *Gleicheniella pectinata*.

TABELA 11 Percentagem de células alteradas em alface e milho após tratamento com os extratos aquosos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa* provenientes das quatro coletas.

		% de alterações	
		Alface	Milho
Coleta 1	Controle	7,3	5,4
	<i>G. pectinata</i>	75,7	29,8
	<i>D. flexuosa</i>	77,8	26,7
Coleta 3	Controle	9,7	6,3
	<i>G. petinata</i>	70,8	30,6
	<i>D. flexuosa</i>	79,4	29,9
Coleta 2	Controle	10,1	6,4
	<i>G. petinata</i>	49,3	15,5
	<i>D. flexuosa</i>	46,7	27,6
Coleta 4	Controle	9,8	5,2
	<i>G. pectinata</i>	43,1	14,7
	<i>D. flexuosa</i>	54,4	28,9

5 DISCUSSÃO

O efeito dos extratos das espécies de líquens *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana* e das espécies de pteridófitas *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa* foi avaliado tanto macroscopicamente (pelo percentual de germinação e crescimento radicular) quanto microscopicamente (pela análise citogenética e de microscopia eletrônica de varredura). De modo geral, foi possível observar que todas as espécies demonstraram potencial alelopático em todas as análises realizadas.

Macroscopicamente, os extratos das espécies foram capazes de interferir no percentual de germinação e/ou no crescimento radicular, tanto em alface (*Lactuca sativa*) quanto em milho (*Zea mays*).

As duas espécies de líquens demonstraram mecanismos de ação diferentes. *Myelochroa lindmanii* interferiu somente no crescimento radicular

tanto em alface quanto em milho, não sendo possível evidenciar qualquer efeito significativo sobre o percentual final de germinação. Já, após tratamento com *Canoparmelia texana*, observou-se efeito significativo sobre o percentual de germinação de alface e milho e sobre o crescimento radicular de alface. As espécies de pteridófitas interferiram tanto no crescimento radicular quanto no percentual de germinação, tanto em alface (*Lactuca sativa*) quanto em milho (*Zea mays*). Paralelamente, retardo no início da germinação em sementes de alface foi observado, após o tratamento com todas as espécies.

O potencial alelopático das espécies de pteridófitas já havia sido estudado anteriormente por Soares e Vieira (2000), que haviam demonstrado o mesmo efeito de inibição no percentual de germinação e crescimento radicular. Os resultados obtidos nesse trabalho foram muito similares aos encontrados em nossos experimentos. Segundo os autores, enquanto o controle mostrou um percentual de germinação de 96,8%, em média, as sementes tratadas com *Gleicheniella pectinata* germinaram, em média, 15,1% contra 32,8% das sementes tratadas com *Dicranopteris flexuosa*. Essas espécies provavelmente liberam seus metabólitos alelopáticos através de tecidos vivos, uma vez que os efeitos de extratos de frondes verdes são mais evidentes do que os extratos de frondes senescentes (Soares e Vieira, 2000).

Ao mesmo tempo, Peres et al. (1998) também já haviam estudado o potencial alelopático dos extratos aquosos e butanólico de *Gleichenia pectinata* (sin. *Gleicheniella pectinata*) sobre sementes de *Clidemia hirta* e *Lactuca sativa*. Segundo esses autores, a atividade alelopática de *Gleichenia pectinata* pode tanto exibir efeito estimulatório para sementes de *Clidemia hirta* quanto inibitório para sementes de *Lactuca sativa*. Estes resultados estão de acordo com a observação de que os aleloquímicos são seletivos em sua ação e que as plantas são diferenciadas em suas respostas (Zeng et al., 2001).

Para a preparação dos extratos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa* utilizados neste trabalho, utilizou-se uma técnica branda

de extração. Segundo Soares e Vieira (2000), a observação de uma redução acentuada no percentual de germinação e no crescimento radicular, mesmo utilizando essa técnica, é um indicativo de que as substâncias alelopáticas são provavelmente muito ativas e/ou muito polares. O efeito tóxico e o aspecto de morte celular observado sobre as radículas assemelham-se ao dano provocado pela ação de substâncias com propriedades semelhantes a um detergente (Soares e Vieira, 2000). Além disso, no processo de preparação dos extratos, a formação de uma espuma persistente era observada, indicativo da presença de substâncias anfipolares, tais como saponinas ou outro tipo de terpenóide glicosilado (Soares e Vieira, 2000). Esta observação está de acordo com alguns trabalhos que recentemente isolaram vários terpenóides glicosilados em espécies de Gleicheniaceae (Shiojima et al., 1995; Aoki et al., 1997, Wada et al., 1998). Foi observado que esses derivados diterpenoídios exibem forte efeito fisiológico sobre plântula de alface, estimulando o crescimento caulinar e/ou inibindo fortemente o crescimento radicular (Munesada, 1992; Aoki et al., 1997).

Essas observações são particularmente importantes quando se discutem as metodologias utilizadas para análise do potencial alelopático. Embora várias metodologias estejam disponíveis na literatura (Putnan e Duke, 1978; Reigosa et al., 1996), a maioria dos bioensaios de alelopatia descrevem os resultados na forma de percentagem de germinação (Malheiros e Peres, 2001). Entretanto, segundo Reigosa et al. (1996), embora a importância ecológica da germinação não possa ser subestimada, muitas vezes o efeito das substâncias alelopáticas revelam uma certa demora na germinação. Essa demora não é necessariamente mortal para a planta receptora e este fato deve ser discutido quando se considera a extrapolação para a condição natural. Assim, nem sempre é possível o real entendimento da ação alelopática de uma espécie somente pela análise do percentual de germinação e do crescimento radicular. Esta observação é particularmente importante quando se observam os resultados dos tratamentos com *Myelochroa lindmanii*. Embora esta espécie não afete o percentual de

germinação tanto em alface quanto em milho, observa-se drástica redução do comprimento radicular. Além disso, a análise do percentual de germinação e do crescimento radicular, em diferentes momentos após a exposição, revelou-se uma estratégia útil na identificação do efeito de retardo do início de germinação causado pelas quatro espécies analisadas, auxiliando na compreensão do mecanismo envolvido na ação alelopática dos extratos. Foi possível observar, por exemplo, que se o percentual de germinação de sementes de alface tratadas com *Myelochroa lindmanii* tivesse sido avaliado somente no período de 36h, redução significativa entre o tratamento com o extrato liquênico e o controle teria sido observado. Neste caso, o potencial alelopático dessa espécie estaria sendo superestimado. Por outro lado, não estaríamos detectando o real potencial alelopático caso a análise tivesse sido feita somente em 72h.

Verifica-se a importância de se adicionar outras metodologias que juntamente com as técnicas convencionais de estudo da alelopatia, esclareçam melhor o modo de ação dessas espécies. Nesse contexto, a citogenética demonstra ser uma importante ferramenta para o estudo do potencial alelopático.

A observação da redução do crescimento radicular como consequência da interferência dos mecanismos de divisão celular tem sido demonstrada em vários trabalhos (Campos e Viccini, 2003; Pires, et al., 2001; Gianfrancisco et al., 1998).

No presente trabalho, pela análise citogenética observou-se que tanto *Myelochroa lindmanii* quanto *Canoparmelia texana* interferiram nos mecanismos de divisão celular.

Myelochroa lindmanii parece agir de forma semelhante à ação de um antimitótico. Algumas dessas substâncias agem sobre a dinâmica de microtúbulos no interior da célula (Jordan e Wilson, 1999). Os microtúbulos exercem importantes funções celulares durante o crescimento e ciclo mitótico, participando de diversos processos, como migração dos cromossomos,

estruturção celular, formação de parede celular entre outros (Jordan e Wilson, 1999).

O tratamento com o extrato de *Myelochroa lindmanii* parece interferir no funcionamento normal dos microtúbulos. Essa hipótese é reforçada pela observação do aumento do número de c-metáfases, de cromossomos com migração tardia e células com duplicação cromossômica, uma vez que, em geral, essas alterações são causadas por distúrbios na dinâmica dos microtúbulos (Haroun e Shehri, 2001). Provavelmente, o extrato de *Myelochroa lindmanii* age interferindo nos processos normais de polimerização e despolimerização dos microtúbulos. Como consequência dessa ação, o ciclo celular se interrompe no estágio de metáfase, distúrbio comumente chamado de c-metáfase, por ter sido observado pela primeira vez após tratamento com colchicina (Sharma e Sen, 2002).

Como consequência de um prolongado efeito de inibição do ciclo em metáfase, algumas células podem se mostrar poliploidizadas, com o número cromossômico duplicado (Sharma e Sem, 2002; Singh, 2003). Este fato pôde ser observado após o tratamento com o extrato de *Myelochroa lindmanii*. A observação de algumas células também com micronúcleos e anáfases multipolares (dados não mostrados) reforça a hipótese de ação dessa espécie sobre microtúbulos. Alguns estudos demonstraram que esses micronúcleos podem surgir a partir dos cromossomos metafásicos condensados espalhados numa c-metáfase (Morejohn et al., 1987; Falconer e Seagull, 1987; Verhoeven et al., 1990). Foi observado que a micronucleação ocorre mediante uma modificação da mitose, na qual os cromossomos metafásicos formam diretamente os micronúcleos, sem que ocorram a divisão do centrômero e a separação das cromátides-irmãs, em virtude da ausência dos microtúbulos (Verhoeven et al., 1990; Ramulu et al., 1995).

A provável explicação, então, para o aumento do índice mitótico causado pelo tratamento com *Myelochroa lindmanii* está na interrupção do ciclo

celular e no acúmulo de células em metáfase. Entretanto, outros fatores podem ter contribuído, tais como o encurtamento do ciclo mitótico e o aumento das células em intérfase que entram nas fases em divisão subseqüentes (Abderrhman, 1998), ou redução na velocidade de divisão celular (Borah e Talukdar, 2002).

Por outro lado, após tratamento com *Canoparmelia texana*, observou-se um mecanismo de ação diferente daquele provocado pelo extrato de *Myelochroa lindmanii*. Os tratamentos com *Canoparmelia texana* provocaram diminuição no índice mitótico, explicado por um aumento do número de células em intérfase. Esta espécie não parece afetar a dinâmica dos microtúbulos. Uma provável explicação para o acúmulo de células em intérfase está na inibição da síntese de DNA, o que já foi demonstrado para algumas substâncias com ação alelopática (Vyvyan, 2002).

Já as espécies de pteridófitas parecem agir de forma semelhante, reduzindo o índice mitótico por um acúmulo de células em intérfase e por um aumento do percentual de morte celular. O acúmulo de células em intérfase, provavelmente está ligado à inibição da síntese de DNA, o que já foi demonstrado para algumas substâncias com ação alelopática (Vyvyan, 2002). Entretanto, outros mecanismos podem estar envolvidos, como por exemplo interrupções em pontos de checagem em G1. Exemplos desse tipo de ação podem ser verificados no ácido secalônico, um metabólito secundário que é um inibidor de proteína quinase (Wang et al., 1996).

A interferência nos mecanismos de divisão celular parece não ser a única responsável pela redução no crescimento radicular. Todas as espécies analisadas induziram aumento do número de morte celular, tanto em alface, quanto em milho. Neste caso, as espécies parecem atuar da mesma maneira, causando apoptose. Este processo é uma forma de “suicídio” celular, geneticamente controlado e envolvido na eliminação específica de células danificadas (Lamar et al., 1999).

Esses resultados são uma evidência de que tanto a inibição do ciclo celular (em intérfase ou metáfase) como a morte celular são, provavelmente mecanismos importantes no processo de inibição do crescimento radicular causado pela ação do extrato das espécies de líquens e pteridófitas.

Esse efeito de interferir no ciclo celular normal já havia sido verificado em vários trabalhos para um grande número de plantas testadas, entre elas, *Piper nigrum* (Abraham e John, 1989); *Pogostemon heyneanus* e *Alinia nutans* (Luz-Dias e Takahashi, 1994); *Viscum cruciatum* (Ahumada et al., 1995); *Phyllanthus orbicularis* (Lamar et al., 1997); *Raphanus sativus* (Gianfrancisco et al., 1998); *Leucaena leucocephala* (Pires et al., 2001) entre outras. Em todas as situações alterações no ciclo celular dependente da concentração e do tempo de exposição aos extratos foram verificados.

Curiosamente, quando se analisa o efeito de *Myelochroa lindmanii*, esta espécie, embora afete os mecanismos normais de divisão celular, não afeta o percentual de germinação. Esta aparente contradição, pode ser explicada por alguns estudos nos quais inibidores específicos de determinadas etapas da mitose não impediram a germinação das sementes de diversas espécies (Labouriau e Spillmann, 1989; Borghetti e Labouriau, 1994). Os resultados desses estudos mostraram que a mitose não é essencial ao processo germinativo para essas espécies, embora possa ser para outras. Isso implica que, para esses casos, a decisão de uma semente entre germinar ou não envolve mecanismos de controle do metabolismo que antecedem as divisões celulares. Os resultados obtidos corroboram estas observações, embora, a explicação para o crescimento radicular até um determinado ponto, mesmo sob influência dos tratamentos com os extratos líquênicos, permaneça desconhecido.

Paralelamente a esses efeitos, as alterações micromorfológicas verificadas por microscopia eletrônica de varredura comprovaram a ação dos extratos das espécies de líquens e pteridófitas. A observação de alterações nas células da coifa, está provavelmente ligada à ação sobre os microtúbulos, que

participam de mecanismos de diferenciação celular. Ao mesmo tempo, a observação de células com aspecto de apoptose comprova o aumento do número de células mortas. Uma provável explicação para o aumento do número de pêlos absorventes está no aumento da capacidade de absorção pela raiz, uma vez que seu crescimento foi inibido.

Além dessas observações, as quatro espécies analisadas demonstraram efeitos clastogênicos, sendo estes efeitos mais evidentes para os tratamentos com *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana*. Nos tratamentos com os líquens, esses efeitos foram evidenciados por um aumento do número de pontes cromossômicas em anáfase e telófase, de cromossomos pegajosos e de fragmentos cromossômicos.

Em metáfases com cromossomos pegajosos, estes perdem a sua aparência normal e são vistos com uma superfície “pegajosa”, causando aglomerados cromossômicos (Babich et al., 1997). Este efeito é geralmente atribuído à toxicidade causada sobre a organização de cromatina nos cromossomos.

Já a presença de fragmentos cromossômicos é um indicativo da ocorrência de quebras, fato comprovado pela presença de anáfases e telófases com pontes cromossômicas (Singh, 2003; Sharma e Sen, 2002). Essas observações demonstraram que de algum modo, os extratos dessas espécies não só interferem no ciclo celular normal, como também afetam a organização da cromatina, chegando a causar quebras cromossômicas. Uma resposta diferenciada entre células de alface e milho pode ser observada. Enquanto em alface, cromossomos pegajosos foram mais evidentes, em milho, pode-se destacar aumento do percentual de pontes cromossômicas. Estes resultados estão de acordo com a observação de que os aleloquímicos são seletivos em sua ação e que as plantas são diferenciadas em suas respostas (Zeng et al., 2001).

Já para os tratamentos com os extratos das espécies de pteridófitas o efeito clastogênico não foi tão evidente. A indução de pontes cromossômicas e

fragmentos não foi significativa para nenhuma coleta em alface quando comparado ao controle. Em milho, em somente uma coleta, a terceira, foi possível detectar diferença significativa em relação ao controle para pontes cromossômicas. Os extratos dessas espécies, parecem então não aumentar de forma drástica a indução de quebras cromossômicas. Entretanto, um efeito clastogênico pode ser verificado para a variável cromossomos pegajosos em células meristemáticas de alface. Esta observação revela uma provável ação dos extratos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa* sobre a organização de cromatina. Entretanto, o mesmo efeito não foi observado sobre os cromossomos de milho. Este tipo de alteração (cromossomos pegajosos) já havia sido observado como o efeito mais evidente em células meristemáticas de *Vicia faba*, após tratamento com o extrato aquoso de *Calotropis procera* (Haroun e Sheri, 2001), bem como já havia sido também previamente relatado por Abderrhman (1998) e Banerjee (1992) para os extratos de *Peganum harmala* e tabaco, respectivamente.

Os diferentes modos de liberação de substâncias alelopáticas são ainda influenciados por diversos fatores ambientais (Carballeira e Reigosa, 1999). A quantidade e qualidade das substâncias liberadas variam devido a fatores internos e externos (Reigosa, 1988). Entre os fatores ambientais estão incluídos temperatura, incidência de luz, pluviosidade e comprimento de períodos secos anteriores (Gliesman e Muller, 1978; Premasthira e Zungontiporn, 1996; Reigosa et al., 1996). Para verificar o efeito ambiental sobre a ação alelopática das espécies, duas coletas em períodos caracteristicamente chuvosos e duas coletas em períodos secos foram realizadas (dados climatológicos em anexo).

Diversos trabalhos têm procurado avaliar o efeito sazonal sobre a liberação de substâncias alelopáticas (Dolling et al., 1994; Nilsson et al., 1998).

Para líquens, alguns trabalhos têm verificado essa influência de fatores ecológicos sobre a concentração de metabólitos secundários. Para o ácido úsnico, sabe-se que sua concentração é fortemente influenciada por vários

fatores ecológicos. Ravinskaya (1991) observou que a luz, a temperatura e a umidade desempenham uma importante função na concentração dos ácidos liquênicos. Variações sazonais na concentração do ácido úsnico em *Usnea aurantiaco* foram detectadas na Antártica (Quilhot et al., 1991). Os resultados mostraram que as concentrações desse ácido são altas no inverno e primavera e baixas no verão e outono, provavelmente em função de variação na intensidade luminosa.

De forma geral, em nossos resultados, foi possível verificar, tanto pela análise macroscópica quanto microscópica, que os efeitos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana* se intensificaram em períodos caracteristicamente chuvosos, correspondentes ao verão. Essa aparente contradição com os resultados de metabolismo do ácido úsnico pode ser explicada pelas diferentes condições ambientais nas quais os trabalhos foram realizados. Efeitos sobre o percentual de germinação, crescimento radicular e alterações citogenotóxicas foram evidenciados e, geralmente, mostram diferenças estatísticas para o controle em períodos chuvosos. Esta observação é particularmente importante para a terceira coleta, realizada em janeiro de 2003. A comparação dos dados climatológicos demonstrou que, provavelmente, a intensidade de precipitação e a umidade relativa do ar são fatores importantes na liberação de substâncias alelopáticas por essas espécies. O efeito maior observado na terceira coleta, provavelmente está relacionado à maior pluviosidade nessa época. Em comparação com a primeira coleta, realizada também em período chuvoso, foi possível observar o dobro de pluviosidade nesse período. Entretanto, a interpretação desses resultados é dificultada, principalmente em condições ambientais tropicais, onde uma uniformidade do clima e estações bem definidas são pouco evidentes. Adicionalmente, os líquens respondem a variações microlimáticas em curtos períodos de tempo, podendo-se afirmar que, mesmo estudos com quatro amostras coletadas ao longo de um ano podem não ser suficientes (Carballeira e Reigosa, 1999).

Já para as espécies de pteridófitas, a época de coleta parece não influenciar de forma drástica no efeito causado pelos extratos, quando utiliza-se como parâmetro o comprimento radicular. Entretanto, os dados citogenéticos, principalmente quando se avaliam morte celular e cromossomos pegajosos, mostram um acentuado aumento em tratamentos provenientes de épocas chuvosas. Este fato pode ser observado por meio das porcentagens totais de células alteradas em alface e milho. É possível observar que, para ambas as espécies utilizadas como modelo, tanto *Gleicheniella pectinata* quanto *Dicranopteris flexuosa* causaram um aumento do número de células alteradas, principalmente nas coletas realizadas em períodos chuvosos. Esse aumento de células alteradas pode ser explicado, principalmente, pelo aumento do número de células mortas, o que parece ser o principal efeito causado pelo tratamento com extratos aquosos dessas espécies de pteridófitas.

Esta observação é particularmente importante por demonstrar a necessidade de acrescentar novas metodologias para entender a atividade alelopática dessas espécies. A citogenética demonstrou ser útil nesse propósito, uma vez que, embora efeitos significativos não tenham sido verificados para crescimento radicular nas diferentes coletas entre os tratamentos de *Gleicheniella pectinata* e *Dicranopteris flexuosa*, a análise do percentual de morte celular e cromossomos pegajosos revelou o efeito sazonal.

Nossos resultados demonstraram que todas as espécies analisadas possuem uma atividade citogenotóxica, manifestada pelos efeitos clastogênicos e sobre o ciclo celular. A citogenética revelou-se uma metodologia bastante útil na contribuição para a elucidação dos mecanismos de ação dos extratos aquosos dessas espécies. Vale destacar ainda que a espécie *Lactuca sativa*, frequentemente não utilizada como modelo de citogenética, mostrou-se um ótimo modelo para o estudo de efeito de substâncias e extratos sobre o ciclo celular e estrutura cromossômica. Características como a possibilidade de utilizar um grande número de sementes, grande superfície de contato com o

extrato aquoso, sensibilidade alta aos efeitos causados pelos líquens e pteridófitas e cromossomos grandes tornaram esta planta muito útil na análise citogenética dos efeitos causados pelos líquens.

Essas espécies mostraram-se potencialmente úteis na bioprospecção de substâncias ativas com possíveis aplicações na área biológica, médica e agronômica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDERRHMAN, S. M. Cytogenetics effects of Peganum harmala extract on Maize root tips. **Cytologia**, Tokyo, v. 63, p. 283-291, 1998

ABRAHAM, M. S.; ABRAHAM, M. S. Studies on the influence of pollutants from titanium factory on growth and cells divisions in *Crotalaria labumigfolia* Linn. **Cytologia**, Tokyo, v. 56, n. 4, p. 555-558, Dec. 1994.

ABREU, J. C. **Potencial alelopático do angico vermelho (*Anadenanthera peregrina* (L.) Speg): Efeito sobre germinação de sementes e ciclo mitótico de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e canafistula (*Peltophorum dubium* (Spreng) Taub).** 1997. 53 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

AHUMADA, M. C.; GARCIA, M. D.; SÁENZ, M. T.; AZNAR, J. Antimitotic and cytostatic activity of *Viscum cruciatum* Sieber parasitic on *Crataegus monogyna* Jacq. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, p. 233-236, 1995.

AL-BEKAIRI, A. M.; QURESHI, S. Effects of (+)-usnic acid on testicular nucleic acids and epididymal spermatozoa in mice. **Fitoterapia**, Milan, v. 62, p. 258-260, 1991.

AL-BEKAIRI, A. M.; QURESHI, S.; CHAUDHRY, M. A.; KRISHNA, D. R.; SHAH, A. H. Mitodepressive, clastogenic and biochemical effects of (+)-usnic acid in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 33, n. 3, p. 217-220, July 1991.

AN, M.; JOHNSON, I. R.; LOVETT, J. V. Mathematical-modeling of allelopathy - biological response to allelochemicals and its interpretation. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, n. 10, p. 2379-2388, Oct. 1993.

AOKI, T.; OHRO, T.; HIRAGA, Y.; SUGA, T.; UNO, M. e OHTA, S. Biologically active clerodane-type diterpene glycosides from the root-stalks of *Dicranopteris pedata*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 839-844, Nov. 1997

BABICH, H.; SEGALL, M. A. e FOX, K. D. The Allium test – A simple, eukaryote genotoxicity assay. **The American Biology Teacher**, Reston, v. 59, n. 9, p. 580-583, Nov.;Dec. 1997

BANERJEE, A. A time course study of the relative cytotoxic effects of extract of different types of Tobacco on *Allium cepa* mitosis. **Cytologia**, Tokyo, v. 57, p. 315-320, 1992.

BARNES, J. Pharmacognosy in the 21st century. **Pharmaceutical Journal**, London, v. 264, p. 701-703, 2000.

BAZIRAMAKENGA, R.; SIMARD, R. R.; LEROUX, G. D. Effects of benzoic and cinnamic acids on growth, mineral composition and chlorophyll content of soybean. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, n. 11, p. 2821-2833, Nov. 1994.

BAZIRAMAKENGA, R.; LEROUX, G. D.; SIMARD, R. R. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 21, n. 9, p. 1271-1285, Sept. 1995.

BINDU, T. K.; SHAFI, P. M.; RAJAN, P. P.; SARMA, Y. R. Antifungal activity of *Uvaria narum* extracts. **Allelopathy Journal**, Hissar, v. 5, n. 1, p. 67-74, Jan. 1998.

BOUFALIS, A.; PELISSIER, F.; TROSSET, L. Response of micorrhizal fungi to allelopathy: *Cenococum geophilum* and *Laccaria laccata* growth with phenolic acids. **Acta Botanica Gallica**, Paris, v. 141, p. 547-550, 1994.

BORAH, S. P.; TALUKDAR, J. Studies on the cytotoxic effects of extract of castor seed (*Ricinus communis* L.). **Cytologia**, Tokyo, v. 67, p. 235-243, 2002.

CALERA, M. R.; ANAYA, A. L.; GAVILANES-RUIZ, M. Effect of phytotoxic resin glycoside on activity of H-ATPase from plasma membrane. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 21, n. 3, p. 289-297, Mar. 1995.

CAMPANELLA, L.; DELFINI, M.; ERCOLE, P.; IACOANGELI, A.; RISULEO, G. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. **Biochime**, Paris, v. 84, n. 4, p. 329-334, Apr. 2002.

CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 1, p. 85-89, Mar. 2002.

CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F. Cytotoxicity of aluminum on meristematic cells of *Zea mays* and *Allium cepa*. **Caryologia**, Florence, v. 56, n. 1, p. 65-73, Jan./Mar. 2003.

CARBALLEIRA, A. e REIGOSA, M. J. Effects of natural leachates of *Acacia dealbata* Link in Galicia (NW Spain). **Botanical Bulletin Academia Sinica**, Taipei, v. 40, n. 1, p. 87-92, Jan. 1999.

CARDARELLI, M.; SERINO, G.; CAMPANELLA, L.; ERCOLE, P.; DE CICCO NARDONE, F. , ALESIANI, O.; ROSSIELO, F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 53, n. 8, p. 667-672, Aug. 1997.

CARVALHO, C. R. e SARAIVA, L. S. A new heterochromatin banding patterns revealed by modified HKG banding technique in maize chromosomes. **Heredity**, Oxford, v. 70, n. 5, p. 515-519, May 1993.

CHAUDHURI, P.; GUPTA, R. K. S.; GHOSH, P. Cytological effects of some heavy metals on root tips meristem of *Nigela sativa*. **Environment and Ecology**, New York, v. 11, n. 1, p. 105-108, 1993.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P. L.; SAVA, G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, New York, v. 89, n. 4, p. 137-146, Apr. 2002.

CORRECHÉ, E. R.; CARRASCO, M.; ESCUDERO, M. E.; VELÁZQUES DE GUZMÁN, A. M. S. Study of the cytotoxic and antimicrobial activities of usnic acid and derivatives. **Fitoterapia**, Milan, v. 69, p. 493-502, 1998.

CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H.; BATISTA, M. A. Plantas medicinais e alelopatia. **Biotecnologia-Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 2, n. 15, p. 28-34, Jul./ago. 2000.

CULBERSON, C. F. **Chemical and botanical guide to lichen products**. University of North Carolina Press, Chapel Hill. N. C., 1969.

CULBERSON, C. F. Supplement to "Chemical and Botanical guide to lichen products". **Bryologist**, Brooklyn, v. 73, p. 177-377, 1970.

CULBERSON, C. F. **Second supplement to "Chemical and Botanical guide to lichen products"**. St. Louis: American Bryological and Lichenological Society, Missouri Botanic Garden, 1977.

DE FEO, V.; SIMONE, F. D.; SENATORE, F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, n. 5, p. 573-578, Nov. 2002.

DOLLING, A.; ZACKRISSON, O.; NILSSON, M. C. Seasonal variation in phytotoxicity of brachen (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, n. 12, p. 3163-3172, Dec. 1994.

EINHELLIG, F. A. Allelopathy: Current Status and Future Goals. In: INDERJIT, DAKSHINI, K. M. M.; EINHELLIG, F. A. **Allelopathy organisms, processes, and applications**. 1995, ACS Symposium series 582.

EINHELLIG, F. A. Interactions involving allelopathy in cropping systems. **Agronomy Journal**, Madison, v. 88, n. 6, p. 886-893, Nov./Dec. 1996.

EINHELLIG, F. A.; RICE, E. L.; RISSER, P. G.; WENDER, S. H. Effects of scopoletin on growth, CO₂, exchange rates, and concentration of scopoletin, scopolin, and chlorogeni acids in tobacco, sunflower, and pigweed. **Bulletin Torrey Botanical Club**, Lawrence, v. 97, n. 1, p. 22-23, 1970.

ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. Sample handling and analysis of allelochemical compounds in plant. **Trends in Analytical Chemistry**, London, v. 20, n. 10, p. 584-590, Sept./Oct. 2001.

ELIX, J. A. Biochemistry of secondary metabolites. In: NASH III, T. H. (Ed.). **Lichen biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p. 154-180.

ELMORE, C. D. Inhibition of turnip (*Brasica rapa*) seed germination by velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) seed. **Weed Science**, Champaign, v. 28, n. 6, p. 658-660, 1980.

FALCONER, M. M.; SEAGULL, R. W. Amiprophos-methyl (APM): a rapid reversible, anti-microtubule agent for plant cell cultures. **Protoplasma**, Vienna, v. 136, 2.;3, p. 124-145, 1987.

FISHER, N. H.; WILLIANSON, G. B.; WEIDENHAMER, J. D.; RICHARDSON, D. R. In search of allelopathy in the Florida scrub: the role of terpenoids. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, p. 1355-1380, 1994.

FISKESJÖ, G. The Allium test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 197, n. 2, p. 243-260, Feb. 1988.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Landskrona, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FORTUNA, A. M.; RISCALA, E. C. , CATALAN, C. A. N.; GEDRIS, T. E.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea diffusa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 30, n. 8, p. 805-808, Aug. 2002.

FRAHM, J. P.; SPECHT, A.; REIFENRATH, K. Allelopathic effect of crustaceous lichens on epiphytic bryophytes and vascular plants. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 70, n. 1/2, p. 245-254, 2000.

FRIEBE, A.; ROTH, U.; KUCK, P.; SHNABLS, H.; SHULZ, M. Effects of 2-4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones on the activity of plasma membrane H ATPase. **Phytochemistry**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 979-983, Mar. 1997.

FRIEDMAN, J.; WALLER, G. R. Seeds as allelopathic agents. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 9, n. 8, p. 1107-1117, Aug. 1983.

GARDNER, C. R.; MUELLER, D. M. J. Factors affecting the toxicity of several lichen acids: effect of pH and lichen acid concentration. **American Journal of Botany**, Ames, v. 68, n. 1, p. 87-95, Jan. 1981.

GIANFRANCISCO, S.; PASTORIZA, A.; RISCALA, E. Efecto alelopático de un extracto clorofórmico de *Raphanus sativus* L. sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de achicoria. **Revista da Faculdade de Agronomia**, Maracaibo, v. 15, n. 5, p. 414-421, sept./oct. 1998.

GLIESSMAN, S. R.; MULLER, C. H. The allelopathic mechanisms of dominance in bracken (*Pteridium aquilinum*) in southern California. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 4, n. 3, p. 337-362, Mar. 1978.

GLIESSMAN, S. R.; MULLER, C. H. The phytotoxic potential of bracken *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. **Madroño**, San Francisco, v. 21, p. 299-304, 1972.

GLIESSMAN, S. R. Allelopathy in a broad spectrum of environments as illustrated by bracken. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 73, n. 1/3, p. 95-104, 1976.

GMELIN, L. Handbuch der organischen. **Chemie**, Paris, v. 5, n. 1, p. 94-97, 1858.

GRANT, W. F. Higher plant assays for detection of chromosomal aberrations and gene mutations – a brief historical background on the use for screening and monitoring environment chemicals. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 426, n. 2, p. 107-112, May 1999.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassay for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 310, n. 2, p. 175-185, Oct. 1994.

GRANT, W. F.; OWENS, E. T. Chromosome aberration assays in *Crepis* for the study of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 410, n. 3, p. 291-307, June 1998.

GRESSEL, J. B.; HOLM, L. G. Chemical inhibition of crop germination by weed seeds and the nature of inhibition by *Abutilon theophrasti*. **Weed Research**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 44-53, Feb. 1964.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C. E. GELBART, W. M. **Introdução à genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 856 p.

HALLAK, A. M. G.; DAVIDE, L. C.; SOUZA, I. F. Effects of Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) root exudates on the cell cycle of the bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.) root. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 1, p. 95-99, Mar. 1999.

HAROUN, S. A.; SHEHRI, M. A. Cytogenetic effects of *Calotropis procera* extract on *Vicia faba* L. **Cytologia**, Tokyo, v. 66, p. 373-378, 2001.

HELDT, H. W. **Plant biochemistry and molecular biology**. Oxford: Oxford University Press, 1997.

HIRADATE, S.; YADA, H.; ISHII, T.; NAKAJIMA, N.; OHNISHI-KAMEYANNA, M.; SUGIE, H.; ZUNGSONTIPORN, S.; FUJII, Y. Three Plant growth inhibiting saponins from *Duranta repens*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 52, n. 7, p. 1223-1228, Dec. 1999.

HONNEGER, R. Functional aspects of the lichen symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 553-578, 1991.

HUNECK, S.; YOSHIMURA, Y. **Identification of lichen substances**. Berlin: Springer, Berlin Heidelberg, 1996.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; CHUNG, G. A. C.; SKÚLASON, V. G.; GISSURARSON, S. R.; VILHEMSDÓTTIR, M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Science**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 141-144, Apr. 1998.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic acid. **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, n. 7, p. 729-736, Dec. 2002.

JANKAY, P.; MULLER, W. H. The relationships among umbelliferone, growth, and peroxidase levels in cucumber roots. **American Journal of Botany**, Ames, v. 63, n. 1, p. 126-132, Jan. 1976.

JANZEN, D. H. **Ecologia vegetal nos trópicos**. São Paulo: EPU/EDUSP, 1980. 78 p.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. The use and action of drugs in analyzing mitosis. **Methods in Cell Biology**, San Diego, v. 61, p. 267-295, 1999.

KRISTMUNDSÓTTIR, T.; ARADÓTTIR, H. A. E.; INGÓLFSDÓTTIR, K.; ÖGMUNDSÓTTIR, H. M. Solubilization of the lichen metabolite (+)-usnic acid for testing in tissue culture. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 54, n. 11, p. 1447-1452, Nov. 2002.

KUITERS, A. T.; van BECKHOVEN, K. and ERNST, W. H. O. Chemical influences of tree litters on herbaceous vegetation. In: FANTA, J. (ed.) **Forest dynamics research in Western and central Europe**. Wageningen: Pudoc, 1986. p. 140-170.

KUMAR, K. C.; MÜLLER, K. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic and diffractaic acid on human keratinocyte growth. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 62, n. 6, p. 821-823, June 1999.

LABOURIAU, L. G.; SPILLMANN, F. V. Germination of seeds in solutions of antimetotics. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 3, p. 355-371, set. 1989.

LAMAR, A. S.; FIORE, M.; CUNDARI, E.; RICORDY, R.; COZZI, R.; DE SALVIA, R. Phyllanthus orbicularis aqueous extract: Cytotoxic, genotoxic, and antimutagenic effect in the CHO cell Line. **Toxicological Applied Pharmacology**, San Diego, v. 161, n. 3, p. 231-239, Dec. 1999.

LAWREY, J. D. Inhibition of moss spore germination by acetone extracts of terriolous *Cladonia* species. **Bulletin of Torrey Botanical Club**, Lawrence, v. 104, n. 1, p. 49-52, 1977a.

LAWREY, J. D. Adaptative significance of methylated lichen depsides and depsidones. **The Lichenologist**, London, v. 9, n. 2, p. 137-142, 1977b.

LAWREY, J. D. Lichen allelopathy – a review. In: INDERJIT, DAKSHINI, K. M. M.; EINHELLIG, F. A. Allelopathy – Organisms, processes, and applications. ACS Symposium series. Botanical Society of America Section, 1995. p. 26-38.

LAWREY, J. D.; ROSSMAN, A. Y.; LOWEN, R. Inhibition of selected hypocrealean fungi by lichen secondary metabolites. **Mycologia**, New York, v. 86, n. 4, p. 502-506, July/Aug. 1994.

LEATHER, G. R.; EINHELLIG, F. A. Bioassays in the study of allelopathy. In: PUTNAM, A. R.; TANG, C. S. **The science of allelopathy**. New York: John Willey, 1986.

LEE, T. T. Role of phenolic inhibitors in peroxidase-mediated degradation of Indole-3-acetic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 3, p. 372-375, Mar. 1977.

LIU, D. H.; JIANG, W.; ZAO, F.; LU, C. Effects of lead on root growth, cell division, and nucleolus of *Allium cepa*. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 86, n. 1, p. 1-4, 1994.

MALHEIROS, A. AND PERES, M. T. L. P. Alelopatia: Interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001. 500 p.

MARCANO, V. **Introducción al estudio de los líquenes y su clasificación**. Mérida: Tecnología Artes y Oficios, 1994. p. 108-135. (Ediciones del Museo de Ciencia).

MERSIE, W.; SINGH, H. Phenolic Acid effect photosynthesis and protein synthesis by isolated leaf cells of velvet-leaf. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, n. 7, p. 1293-1301, July 1993.

MIZUTANI, J. Selected allelochemicals. **Critical Reviews and Plant Sciences**, Boca Raton, v. 18, n. 5, p. 653-651, May 1999.

MILLER, D. A. Allelopathy in Forage Crop Systems. **Agronomy Journal**, Madison, v. 88, n. 6, p. 854-859, Nov./Dec. 1996.

MOLISCH, H. **Der Einfluss einer Pflanze auf die andere** – allelopathie. Jena, Germany: Fisher, 1937.

MULLER, C. H. Inhibitory terpenes volatilized from *Salvia* shrubs. **Bulletin of Torrey Botanical Club**, Lawrence, v. 92, n. 1, p. 38-45, 1965.

MUNESADA, K. Biologically active labdane-type diterpene glycosides from the root-stalks of *Gleichenia japonica*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 1533-1536, May 1992.

MOREJOHN, L. C.; BUREAU, T. E.; MOLÉBAJER, J.; BAJER, A.; FOSKET, D. E. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. **Planta**, Berlin, v. 172, n. 2, p. 41-147, Oct. 1987.

NASSAR, M. I. **The potential of some Juvenoids, precocnes and botanical extracts for the control of *Muscina stabulans* (Diptera-Muscidae)**. 1995. Thesis (Ph.D) - Cairo University Egypt, Cairo.

NILSSON, M. C.; GALLET, C.; WALLSTEDT, A. Temporal variability of phenolics and batatasin-III in *Empetrum hermaphroditum* leaves over eight-year period: interpretations of ecological functions. **Oikos**, Copenhagen, v. 81, n. 1, p. 6-16, Feb. 1998

NOGUCHI, H. K. Isolation and Identification of an allelopathic substance in *Pisum sativum*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 62, n. 7, p. 1141-1144, Apr. 2003.

ODEIGAH, P. G. C.; NURUDEEN, O.; AMUND, O. O. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. **Hereditas**, Landskrona, v. 126, n. 2, p. 161-167, 1997.

PALIT, S.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Effects of cobalt on plants. **Botanical Review**, Bronx, v. 60, n. 2, p. 149-161, Apr./June 1994.

PANDEY, D. K. Relative toxicity of allelochemicals to aquatic weeds **Allelopathy Journal**, Hissar, v. 3, p. 241-246, 1996.

PEÑUELAS, J.; RIBAS-CARBÓ, M.; GILES. Effect of allelochemicals on plant respiration and oxygen isotope fractionation by the alternative oxidase. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, p. 801-805, 1996.

PERES, M. T. L. P.; PIZZOLATTI, M. G.; QUEIROZ, M. H.; YUNES, R. A. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 2, p. 131-137, fev. 1998.

PERRY, N. B.; BENN, M. H.; BRENNAN, N. J.; BURGESS, E. J.; ELLIS, G.; GALLOWAY, D.J.; LORIMER, S. D.; TANGNEY, R. S. Antimicrobial, Antiviral and Cytotoxic activity of New Zealand lichens. **Lichenologist**, London, v. 31, n. 6, p. 627-636, Nov. 1999.

PIRES, N. M.; SOUZA, I. R. P.; PRATES, H. T.; FARIA, T. C. L.; FILHO, I. A. P.; MAGALHÃES, P. C. Efeito do extrato aquoso de *Leucena* sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 1, p. 55-65, abr. 2001.

POSER, G. L. AND MENTZ, L. A. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação. In: SIMÕES, C. M. O.; SCBENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MANTZ, L. A.; PATROVICK, P. R. **Farmacognosia – da Planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis: Porto Alegre: Ed Universidade/UFRGS ; Florianópolis: UFGSC, 2000. 821 p.

PRASAD, M. N. V.; SUBHASHINI, P. Mimosine-inhibited seed germination, seedling growth and enzymes of *Oryza sativa* L. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, n. 7, p. 1689-1696, July 1994.

PREMASTHIRA, C. U.; ZUNGSONTIPORN, S. Allelopathic effects os extract substances from gooseweed (*Sphenoclea zeylanica*) on rice seedlings. **Weed Research**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 79-83, Feb. 1996.

PROKSA, B.; STURDIKOVA, M.; PRONAYOVA, N.; LIPTAJ, T. (-) – Usnic acid and its derivatives. Their inhibition of fungal growth and enzyme activity. **Pharmazie**, Eschborn, v. 51, n. 3, p. 195-196, Mar. 1996.

PUTNAM, A. R.; DUKE, W. D. Allelopathy in agroecosystems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 16, p. 431-451, 1978.

QUEIROZ, M. H. **Approche phytoécologique et dynamique des formations végétales secondaires développées après abandon des activités agricoles, dans le domaine de la Forêt Ombrophile dense de versant (Forêt**

Atlantique) à Santa Catarina – Brésil. 1994. 251 p. Thesis (Ph.D) - École Nationale du Génie Rural des Eaux et de Forêts, Nancy.

RAJENDIRAN, K. Cytological effects of water extract of *Boerhaavia diffusa* root on *Helianthus annuus*. **Advances in Plant Sciences**, New York, v. 13, n. 1, p. 133-137, 2000.

RAMULU, K. S.; DIJKHUIS, P.; RUTGERS, E.; BLASS, J.; VERBEEK, W. H. J.; HERHOEVEN, H. A. e COLIJN-HOOYMANS, C. M. Microprotoplast fusion technique: a new tool for gene transfer between sexually-incongruent plant species. **Euphytica**, Wageningen, v. 85, n. 1/3, p. 255-268, 1995.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 312, n. 1, p. 17-24, Feb. 1994.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosurea, maleic hydrazide, sodium azide and ethylmethane sulphonate. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 390, n. 1, p. 121-127, Apr. 1997.

REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLES, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 18, n. 5, p. 557-608, May 1999.

REIGOSA, M. J.; SOUTO, X. C.; GONZÁLES, L. Allelopathy research, methodological, ecological and evolutionary aspects. In: NARWAL, S. S.; TAURO, P (Ed.). Allelopathy, field observations and methodology. 1996. v. 1, p. 213-231.

REIGOSA, M. J. **Estudio del Potencial alelopático de Acacia dealbata Link.** 1988. Thesis (Ph. D) - Universidad de Santiago de Compostela 10, Santiago.

RIBEIRO, C. H. **A família Parmeliaceae (Ascomycota liquenizados) em regiões montanhosas dos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo.** 1998. 194 p. Dissertação (Mestrado)-Universidade de São Paulo, Botucatu, SP.

RICE, E. L. **Allelopathy.** London: Academic Press, 1984. 422 p.

RODRIGUES, G. S.; MADKOURS, S. A.; WEINSTEIN, L. H. Genotoxic activity of ozone in *Tradescantia*. **Environment and Experimental Botany**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 45-50, May 1996.

RODRIGUES, G. S. **Bioensaios de toxicidade genética com *Tradescantia***. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 56 p.

ROMAGNI, J. G.; MEAZZA, G.; NANAYAKKARA, D.; DAYAN, F. E. The phytotoxic lichen metabolite usnic acid is a potential inhibitor of plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **FEBS Letter**, Amsterdam, v. 480, n. 2/3, p. 301-305, Sept. 2000.

RONCHI, V. N.; BONATI, S.; DURANTE, M.; TURCHI, G. Preferential localization induced breaks in heterochromatic regions of *Vicia faba* and *Allium cepa* chromosomes-II. 4-epoxyethyl-1,2-epoxy-cyclohexane interacts specifically with highly repetitive sequence of DNA in *Allium cepa*. **Environment and Experimental Botany**, Oxfoed, v. 26, n. 2, p. 127-135, Apr. 1996.

SCRIVANTI, L. R.; ZUNINO, M. P.; ZYGADLO, J. A. Tagetes minuta and Schinus areira essential oils as allelopathic agents. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxfoed, v. 31, n. 6, p. 563-572, June 2003.

SEIGLER, D. S. Chemistry and Mechanisms of Allelopathic Interactions. **Agronomy Journal**, Madison, v. 88, n.6, p. 876-885, Nov./Dec. 1996.

SHARMA, A.; SEN, S. **Chromosome botany**. Enfield: Science Publishers, 2002. 155 p.

SHEHAD, A. S. Comparative cytological studies of the effects of some aliphatic alcohols and the fatty alcohols from *Euphoria granulata* and *Pulicari crispa* on mitosis of *Allium cepa*. **Cytologia**, Tokyo, v. 45, p. 507-513, 1980.

SHIBAMOTO T.; WEI, C. I. Mutagenicity of lichens constituents. **Environment Mutagenesis**, New York, v. 6, n. 5, p. 757-762, 1984.

SHIOJIMA, K.; SUZUKI, M.; AOKI, H. and AGETA, H. Fern constituents: Four new diterpenoid glycosides from fresh leaflets of *Gleichenia japonica*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, tokyo, v. 43, n. 1, p. 5-8, Jan. 1995.

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2003. 463 p.

SOARES, G. L. G.; VIEIRA, T. R. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. "Grand Rapids") por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 190-197, jan./dez. 2000.

SOUTO, X. C.; REIGOSA, M. J.; GONZÁLES, L. **Effect of potential phenolic allelochemicals released by *Capsicum annuum* on the growth of some**

microorganisms populations. In: ANNUAL MEETING PLANT GROWTH REGULATION SOCIETY, 22., 1996. **Proceedings...** 1996. p. 181-85.

SOUTO, X. C.; GONZÁLES, L.; REIGOSA, M. J. Allelopathy in forest environment in Galicia (NW Spain). **Allelopathy Journal**, Hissan, v. 2, n. 1, p. 67-78, 1995.

SWAMI, U. B. S.; KUMAR, C. V. Effect of lecanoric acid on mitotic division in *Allium sativum*. **Current Science**, Bangalore, v. 45, n. 17, p. 636-637, 1976.

VAUGHN, S. F.; BERHOW, M. A. 1-cyano-2-hydroxy-3-butene, a phytotoxin from crambe (*Crambe abyssinica*) seedmeal. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 24, n. 6, p. 1117-1126, Oct. 1998.

VERHOEVEN, H. A.; RAMULU, K. S. e DIJKHUIS, P. A. Comparison of the effects of various spindle toxins on metaphase arrest and formation of micronuclei in cell-suspension cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Planta**, Berlin, v. 182, n. 2, p. 408-411, Oct. 1990

VICCINI, L. F. **Variações cromossômicas induzidas em milho via grão de pólen.** UFV, 1998. 131 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

VIJAYAKUMAR, C. S.; VISWANATHAN, S.; KANNAPPA, R. M.; PARVATHAVARTHINI, S.; KUNDU, A. B.; SUKUMAR, E. . Antiinflammatory activity of (+)-usnic acid. **Fitoterapia**, Milan, v. 71, p. 564-566, 2000.

VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, Oxford, v. 58, n. 9, p. 1631-1646, Feb. 2002.

WADA, H.; SHIMIZU, Y.; HAKAMATSUKA, T.; TANAKA, N.; CAMBIE, R. C. and BRAGGINS, J. E. Two new clerodane glycosides from *Gleichenia microphylla*. **Australia Journal of Chemistry**, Melbourne, v. 51, n. 2, p. 171-173, 1998.

WANG, B. H.; POLYA, G. M.; WANG, B. H. The fungal teratogen secalonic acid D is an inhibitor of protein kinase C and of cyclic AMP-dependent protein kinase. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 62, n. 2, p. 111-114, Apr. 1996.

WILLIAMS, D. E.; BOMBUWALA, K.; LOBLOVSKY, E.; DE SILVA, E. D.; KARUNARATNE, V.; ALLEN, T. M.; CLARDY, J.; ANDERSEN, R. J. Anbewelamides A and B, antineoplastic epidithiapiperediones isolated from

the lichen species *Usnea* sp. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 39, n. 52, p. 9579-9582, Dec. 1998.

YU, J. Q.; MATSUI, Y. Effect of root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals on ion uptake by cucumber seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 23, n. 3, p. 817-827, Mar. 1997.

XUAN, T. D.; TSUZUKI, E.; UEMATSU, H.; TERAO, H. Effect of alfalfa (*Medicago sativa* L.) pellets on weed control in rice. **Allelopathy Journal**, Hissar, v. 9, n. 2, p. 195-203, 2002.

ZENG, R. S.; LUO, S. M.; SHI, Y. H.; SHI, M. B.; TU, C. Y. Physiological and biochemical mechanism of allelopathy of Secalonic Acid F on higher plants. **Agronomy Journal**, Madison, v. 93, n. 1, p. 72-79, Jan./Feb. 2001.

ZOBEL, A. M.; LYNCH, J. M. Extrusion of UV-absorbing phenolics in *Acer* spp. In response to UV na freenzing temperature. I. UV A-absorbing compounds on the surface of *Acer saccharum* and *Acer platamoides* autumm leaves. **Allelopathy Journal**, Hissar, v. 4, p. 269-276, 1997.

ANEXO

ANEXO A	Página
TABELA 1A Dados climatológicos referentes aos períodos de coleta das espécies.....	86

TABELA 1A Dados climatológicos referentes aos períodos de coleta das espécies.

Coleta	Temperatura	Umidade	Precipitação
Janeiro de 2002	23°C	79%	55,6mm
Janeiro de 2003	22,4°C	82,7%	105,3mm
Agosto de 2002	17,8°C	68,3%	0mm
Agosto de 2003	18,4°C	69,3%	0mm

* Dados obtidos no Laboratório de Climatologia e Análise Ambiental da Universidade Federal de Juiz de Fora.