

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

RAFAELA CARVALHO TIGRE

INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DOS
ALELOQUÍMICOS DE *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. SOBRE
Lactuca sativa L. e *Solanum lycopersicum* Mill.

Orientadora: Dr^a. Eugênia Cristina G. Pereira
Co-Orientador: Dr. Carlos Vicente Córdoba

RECIFE
2014



RAFAELA CARVALHO TIGRE

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DOS
ALELOQUÍMICOS DE *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. SOBRE
Lactuca sativa L. e *Solanum lycopersicum* Mill.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica – CCB – UFPE, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutora em Biologia Vegetal.

Orientadora: Dr^a. Eugênia Cristina G. Pereira

Co-Orientador: Dr. Carlos Vicente Córdoba

RECIFE
2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Tigre, Rafaela Carvalho
Investigação dos mecanismos de ação dos aleloquímicos de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. sobre *Lactuca sativa* L. e *Solanum lycopersicum* Mill./ Rafaela Carvalho Tigre – Recife: O Autor, 2014.

241 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Eugênia Cristina G. Pereira

Coorientador: Carlos Vicente Córdoba

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Biologia Vegetal, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

**1. Metabólitos 2. Ácidos 3. Herbicidas I. Pereira, Eugênia
Cristina G. (orientadora) II. Córdoba, Carlos Vicente
(coorientador) III. Título**

581

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-104

RAFAELA CARVALHO TIGRE

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DOS
ALELOQUÍMICOS DE *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. SOBRE
Lactuca sativa L. e *Solanum lycopersicum* Mill.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica – CCB – UFPE, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutora em Biologia Vegetal.

Aprovada em 28/02/2014 pela Banca Examinadora:

Profa. Dra Eugênia Cristina Gonçalves Pereira
(Orientadora)

Profa. Dra. Maria Estrella Legaz
(Universidad Complutense de Madrid)

Profa Dra. Terezinha Rangel Câmara
(UFRPE)

Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos
(UFPE)

Prof. Dr. Marcelo Francisco Pompelli
(UFPE)

*A Deus, porque Dele, por
Ele e para Ele são todas as coisas.*

*Aos meus pais por
caminharem sempre comigo,
transmitindo verdades, apoio,
incentivo, orientação e amor.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível sem a valiosa contribuição de várias pessoas às quais expresso minha sincera gratidão. A todos que, com um pequeno gesto, me motivaram nessa caminhada:

A Deus pela oportunidade e privilégio de ter me permitido chegar até aqui, por sua presença constante, me dando força em todos os momentos, por ser a minha alegria e minha esperança. A Ele toda honra, toda Glória e todo Louvor para todo sempre.

Aos meus pais, Rosângela Tigre e Jesuino Tigre, pela formação pessoal, por sempre me apoiarem e me ajudarem em todos os momentos. Pelos cuidados mesmo distantes e por entender a minha ausência em muitos momentos. Em especial a minha mãe, minha melhor amiga, irmã, confidente, intercessora, incentivadora ... a ela que sonha junto comigo os sonhos mais loucos e sempre me faz prosseguir ... ir além e alcançar lugares onde eu nunca imaginei estar. A eles que amo muito, muito obrigada!

A Profa. Eugênia, minha orientadora e amiga, por quem tenho grande admiração. A ela, que sempre fez os obstáculos parecerem menores, agradeço pela orientação e pela oportunidade, pelos ensinamentos e principalmente pela amizade e carinho que conduziu a minha orientação.

Ao Prof. Carlos Vicente e a Profa Estrella, pela acolhida como sua co-orientanda, pela confiança, ensinamentos, paciência, amizade e incentivos. Me sinto extremamente honrada em tê-los como meus orientadores e fazer parte da grande família "The Lichen Cane Team". Tenho muita admiração pelo profissionalismo e pela pessoa que são.

Ao Prof. Nicácio e ao Prof. Mauro Guida, pelo apoio amizade e uso dos laboratórios de Produtos Naturais e Ecofisiologia Vegetal.

A minha amiga-irmã Rebecca, por estar sempre me apoiando com amor e alegria. Obrigada pelo momentos, conhecimentos compartilhados, pela linda e sincera amizade, ajuda e atenção em todos os momentos. Obrigada por me receber tão bem e sempre ser benção em minha vida. A você, Júnior e sua linda família, meu obrigada sempre.

Ao Marciel, meu grande “amiguinho”, por todo carinho, pelo sorriso constante e pela ajuda incansável. Obrigada por me ajudar a crescer, incentivar, participar, pelas conversas, conselhos e e pelo imenso prazer de termos trabalhado em alguns momentos juntos. Valeu amiguinho... muitíssimo obrigada!!!

Aos meus irmãos, Junior e Rafael, por entenderem a minha ausência e me apoiarem. Especialmente ao meu irmão Junior pelo companherismo e cuidados mesmo a distância.

A Eva, Borja, Nicole, Helena, Mara e Profa. Blanca, do Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidad Complutense de Madrid, The Lichen Cane Team, pela ajuda nas análises e por me ensinarem algumas técnicas durante os experimentos; pela pronta e amigável disposição sempre que precisei. Jamais me esquecerei da “música dos passarinhos” cantada pelos almofarizes e pistilos quando se encontravam com *Lactuca sativa* e *Solanum lycopersicum*.

Ao Professor Juan Luis Santos pela atenção, disposição e ajuda nas análises citogenéticas.

Ao Professor Roberto de Armas pela ajuda com o HPLC-MS para a busca da identificação das substâncias ainda não identificadas nos extratos.

Ao Professor Roberto Armas pela ajuda com as nálises no HPLC-MS para busca das identificações das substâncias não

As minhas grandes amigas, Danielle e Maria do Céu, que mesmo longe se faziam presentes nas mensagens e nas ligações, sempre participando de momentos preciosos durante essa caminhada.

A Géssica, minha chuchuzinha, pelo convívio e amizade.

A Rebeca Rivas, pela amizade e pronta disposição em me ajudar.

A Lourdes, Helena, Bruno e Rebeca Valença, pela ajuda durante a preparação dos extratos.

Ao meu grande amigo Fábio Castro que mesmo diante de tantas adversidades, nunca deixou de sonhar comigo esse sonho.

Aos meus ávos, tios e em especial tia Rineide e tia Reija por sempre me incentivarem e admirarem. Amo-os!

A tia Rosi, Eliel, Ruanny e Naroa pelo apoio integral em todos os momentos em que estive na Espanha. Pelas maravilhosas viagens e conhecimentos da vida espanhola. Obrigada por fazerem da minha estada em Madrid uma experiência além de um estágio científico ... uma inesquecível experiência! Amo-os e sinto saudades!

Ao Hildebrando, secretário do PPGBV, por seu humor e disposição em ajudar.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Biologia Vegetal, a Capes e a Facepe que tornaram possível a realização deste trabalho por meio da concessão das bolsas de estudos.

Enfim, sou imensamente grata a minha família, amigos e aqueles que contribuíram direta ou indiretamente a realização deste trabalho. Deus sempre me surpreende e sabe o que é melhor para mim e escolheu cada um dos que aqui estão citados e dos que também não estão de uma maneira muito especial para fazer parte da minha história. Essa caminhada foi uma extraordinária experiência... uma grande aventura que valeu a pena viver.

Muito obrigada!!!

*Porque desde a antiguidade
não se ouviu, nem com
ouvidos se percebeu, nem com
os olhos se viu Deus além de
ti, que trabalha para aquele
que nele espera.*

Isaías 64.4

RESUMO

Metabólitos secundários produzidos e liberados por plantas, bactérias, fungos e líquens estão envolvidos numa variedade de processos ecológicos, nomeados como aleloquímicos. Além das suas possíveis funções ecológicas, muitos dos metabólitos secundários são fitotóxicos, constituindo uma fonte relativamente inexplorada de novos herbicidas. Nesse âmbito reside a possibilidade de obtenção de novas moléculas para novos alvos moleculares, alternativos aqueles dos atuais herbicidas, sendo mais atraentes quanto mais frequentes forem as resistências a esses. Vários aleloquímicos podem ser seletivos em suas ações e as plantas podem ser seletivas em suas respostas. Por este motivo, torna-se difícil sintetizar o modo de ação desses compostos, levando muitos estudos a se restringirem apenas a modificações na germinação e nos padrões de crescimento da planta-teste, sem considerar os eventos celulares relacionados às mudanças fisiológicas. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar os mecanismos de ação dos aleloquímicos de *Cladonia verticillaris* sobre *Lactuca sativa* e *Solanum lycopersicum*. Visando uma compreensão mais completa e abrangente das propriedades alelopáticas de líquens e dos possíveis efeitos sobre outros organismos, esta pesquisa propôs realizar abordagens experimentais *in vivo* e *in vitro*, visto que os extratos de *C. verticillaris* inibem, estimulam ou geram a morte de plântulas de *Lactuca sativa* dependendo do extrato e da concentração utilizada. Esta pesquisa investigou as alterações fisiológicas e bioquímicas, através das análises morfológicas, ultraestrutural, da taxa fotossintética e de danos oxidativos. Verificou-se também o efeito da radiação gama e da ureia exógena no talo líquênico, como simulação de estresse abiótico, obtendo respostas através da produção de aleloquímicos e, conseqüentemente, do seu potencial alelopático. Observou-se que os compostos fenólicos de líquens geram estresse oxidativo nas plântulas de *L. sativa* e *S. lycopersicum*, provenientes da alteração da cadeia transportadora de elétrons, e que a intensidade desse dano possui especificidade e varia de acordo com o extrato e concentração utilizada. Notou-se que as substâncias líquênicas causam disfunções celulares, destruindo algumas organelas como cloroplastos, podendo induzir a peroxidação e provocar um rompimento celular generalizado que finalmente conduz à morte da célula. Constatou-se que a radiação altera o metabolismo líquênico e potencializa as atividades alelopáticas e que a ureia promove a atividade da urease nos talos de *C. verticillaris*. Os efeitos observados foram comparados com padrões, como os ácidos fumarprotocetrárico e protocetrárico, e o herbicida clortoluron, verificando-se que as respostas obtidas frente aos extratos refletem uma interação sinérgica ou antagônica entre os aleloquímicos, e que muitas ações são mais eficazes que as do herbicida. Diante desses resultados acredita-se que *C. verticillaris* possa ser usada como fonte de bioherbicida que, além de eventuais vantagens ambientais, tem possibilidade de aumentar o número, ainda relativamente reduzido, de locais de ação de herbicidas.

Palavras-chave: Ácido fumarprotocetrárico, ácido protocetrárico, substâncias líquênicas, bioherbicida, fotossistema II, estresse oxidativo

ABSTRACT

Secondary metabolites produced and released by plants, bacteria, fungi and lichens are involved in a variety of ecological processes, namely as allelochemicals. Additionally, aside from its possible environmental functions, many secondary metabolites are phytotoxic, constituting a relatively unexplored source for new herbicides. In this context resides the possibility of getting new molecules to new molecular targets, alternatives to current herbicides. Several allelochemicals can be selective in their actions and plants can be selective in their responses. For this reason, it is difficult to synthesize the action model of these compounds, leading many studies to be restricted only to changes in germination and growth patterns of the test plant, without considering cellular events related to physiological changes. Thus, the present study aimed to investigate the mechanisms of action of *Cladonia verticillaris* allelochemicals on *Lactuca sativa* and *Solanum lycopersicum*. For a more complete and comprehensive understanding of the allelopathic properties of lichens and their possible effects on other organisms, this research proposed to carry out *in vivo* and *in vitro* experimental approaches. Since the extracts of *C. verticillaris* inhibit, stimulate and generate the death of seedlings of *Lactuca sativa* depending on the extract and concentration used, this research investigated physiological and biochemical changes, through morphological ultrastructural analysis, the photosynthetic rate and oxidative damage. There was also the effect of gamma radiation and exogenous urea on lichen thallus as simulation of abiotic stress, obtaining responses through the production of allelochemicals and hence its performance in allelopathic potential. It was observed that lichen phenolic compounds generate oxidative stress in *L. sativa* seedlings and *S. lycopersicum*, from the change in the electron transport chain, and that the intensity of this damage has specificity and varies according to extract and concentration. It was noted that lichen substances cause cellular dysfunctions destroying some organelles such as chloroplasts and inducing peroxidation and cause a generalized cell disruption that ultimately leads to cell death. It was found that radiation alters the metabolism and increases lichen allelopathic activities and that urea produces urease activity in *C. verticillaris* thalli. The observed effects were compared to standard substances, as fumarprotocetraric and protocetraric acids, and the herbicide chlortoluron, where it was found that the responses obtained by extracts reflect a synergistic or antagonistic interactions between allelochemicals and that many actions were more effective than herbicide. Given this result it is possible that *C. verticillaris* can be used as a source of bioherbicide, which in addition to any environmental advantages, it has possibility to increase the still relatively small number of herbicides action sites.

Key-words: fumarprotocetraric acid, protocetraric acid, lichen substances, bioherbicide, photosystem II, oxidative stress

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- Figura 1.** Micrografia eletrônica de varredura de uma seção transversal de *Parmelia sulcata*. Visualização da associação simbiótica de um fungo (finas estruturas tubulares finas) e uma alga (esferas verdes). Ampliação: 480 X.....40
- Figura 2.** Esquema simplificado do processo fotossintético.57
- Figura 3.** Distribuição de elétrons na orbital externa da molécula de oxigênio e redução desta a água com a formação de EROs na cadeia transportadora de elétrons.....60
- Figura 4.** Modelo estrutural do ácido fumarprotocetrárico (a) e protocetrárico (b).65
- Figura 5.** Modelo estrutural da atranorina65
- Figura 6.** Reação entre 3-metil ácido orselínico e ácido fumárico para obtenção do ácido fumarprotocetrárico. Fonte: Honda, 1997.....66
- Figura 7.** Reação de formação do ácido fumarprotocetrárico por esterificação do grupo CH₂OH da posição 3' do ácido protocetrárico com ácido fumárico. Fonte: Honda, 1997.....67
- Figura 8.** Rota metabólica do ácido fumarprotocetrárico (Fonte: Pereira *et al.*, 1999 com modificações)68

CAPÍTULO 1: Potential phenolic bioherbicides from *Cladonia verticillaris* produce ultrastructural changes in *Lactuca sativa* seedlings

- Figura 1.** Scheme showing chemical structure and proposed biosynthetic pathway of atranorin-derived depsidones in the lichen *Cladonia verticillaris*.....104
- Figura. 2.** Transmission electron micrographs of longitudinal cuts of *L. sativa* roots from control seeds, germinated and growing in absence of phenols of *C. verticillaris*. A) Apical segment of the root in that it can appreciated the caliptra and both apical and subapical meristems. B) Magnification of the strictly apical zone showing the two main types of cells that compose the organ, the peripheral cells and the statocysts. C) Peripheral cells of the caliptra. D) Cells of the caliptra (statocysts) showing the starchy statolythes. E) Pavement cells of the subapical parenchyma of the root showing interfinger-shaped lobes and indentations.107
- Figura 3.** Transmission electron micrographs of transverse cuts of roots of *L. sativa* from seeds control, germinated and growing in absence of phenols of *C. verticillaris*. A) Pavement cells in of the subapical parenchyma of the root showing interfinger-shaped lobes and indentations. B) Magnification of a zone of the pavement parenchymatous cells.....108
- Figura 4.** Transmission electron micrographs of transverse cuts of roots of *L. sativa* from seeds germinated and growing in the presence of *C. verticillaris* phenols (2.5 mg mL⁻¹) extracted with acetone. A and B) Zone of the subapical parenchyma showing pavement cells that have losing their ability to form lobes and indentations. C) Magnification of a root parenchymatous cell showing numerous mitochondria and part of the endoplasmic reticulum. D) Pavement parenchymatous cell in division after losing its capacity of

indentation. E) Detail of mitochondria and endoplasmic reticulum highly folded in root parenchymatous cell. F) Detail of the peripheral cytoplasm showing a dictyosome and the sequence of traffic of the TGN vesicles towards the plasmatic membrane. Numbers 1, 2 and 3 indicate the sequence of pinocytosis toward the periplasmic space. G) Magnification of a cytoplasmic zone showing increased number of mitochondria.....109

Figura 5. Transmission electron micrographs of transverse cuts of leaves of *L. sativa* seedlings from control seeds, germinated and growing in absence of phenols of *C. verticillaris*. A) Epidermis and spongy parenchyma. B) A different zone of the same tissue showing the peripheral disposition of chloroplasts. C) Magnification of two epidermal cells and some cells of the spongy underlying parenchyma. D) Mitochondria and vacuoles of epidermal cells. E) Chloroplast of a cell from the palisade parenchyma in. F) Magnification of the chloroplast, showing intergranal lamellae, grana and lipidic bodies.110

Figura 6. Transmission electron micrographs of transverse cuts of leaves of *L. sativa* seedlings from seeds germinated and growing in the presence of *C. verticillaris* phenols (2.5 mg mL^{-1}) extracted with acetone. A) Palisade parenchyma. B) Early deformation of chloroplasts of the palisade parenchymatous cells by action of *C. verticillaris* phenols absorbed by the root and translocated up to the leaves. C) Magnification of a still not modified chloroplast and of mitochondria that have eliminated their internal combs. D) Degenerate chloroplasts in those who eliminate the intergranal membranes have been eliminated and the grana fuse to form amorphous lipidic bodies in the stroma of the chloroplast. E) Magnification of a degenerated chloroplast.111

Figura 7. Transverse cuts of roots (A and B) and leaves (C to I) of *L. sativa* seedlings growing on methanolic extract of *C. verticillaris* ($2.5 \text{ mg phenols mL}^{-1}$). A) Parenchymatous, pavement turgent cells

of a root showing loss of both lobes and indentations. B) Endoplasmic reticulum of the same cells. C) Cells of palisade leaf parenchyma showing intact, non-altered chloroplasts. D) Cells of palisade leaf parenchyma showing grana-depleted chloroplasts. E) Highly modified chloroplast showing a great central body and residual grana displaced to the periphery of the organelle. F) Epidermal cell showing the nucleus and numerous mitochondria. G) Highly degraded chloroplast from palisade parenchyma cell. H) A plasmodesmata connecting two two neighboring cells and occluded by unidentified material. I) Degaged thylakoids from grana of a degraded chloroplast.....112

Figure 8. Transverse cuts of leaves of *L. sativa* seedlings growing on chloroformic extract of *C. verticillaris* (2.5 mg phenols mL⁻¹). A) Palisade parenchymatous cell showing active dictyosome showing active dictyosome, mitochondria and a degrade chloroplast. B) Endoplasmic reticulum of the same cells. C) Cells of spongy leaf parenchyma showing intact, non-altered chloroplasts. D) Cells of palisade leaf parenchyma showing normal, unmodified chloroplasts as well as a chloroplast without intergranal lamellae. E) Highly modified chloroplast showing a great central body and residual grana displaced to the periphery of the organelle.....114

Figure 9. Transverse cuts of leaves of *L. sativa* seedlings growing on diethyl ether extract of *C. verticillaris* (2.5 mg phenols mL⁻¹). A) Leaf epidermis showing the guard cells of a stomata. B) Cells of palisade leaf parenchyma showing mitochondria chloroplasts without intergranal lamellae. C) Highly modified chloroplast showing several mitochondria and chloroplasts with molten thylakoids forming electron-dense, amorphous bodies. D) Palisade parenchymatous cell showing spiral-arranged endoplasmic reticulum.....116

**CAPÍTULO 2: ESTRESSE OXIDATIVO E FOTOSSINTÉTICO DE CÉLULAS
DE *Lactuca sativa* E *Solanum lycopersicum* MEDIADOS POR ALELOQUÍMICOS
DE *Cladonia verticillaris***

Figura 1. Valores médios da concentração de clorofila a (A), clorofila b (B), carotenoides (C), clorofila total (D) e atividade do fotossistema II, PSII (E) de plântulas de *Lactuca sativa* germinadas em diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* (EE: extrato etéreo, EC: extrato clorofórmico e EA: extrato acetônico) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³, e seus aleloquímicos isolados (ácido fumarprotocetrárico: FUM e ácido protocetrárico: PRO) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 12 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p <0,05), médias ± SE, n = 3.133

Figura 2. Valores médios da concentração de clorofila a (A), clorofila b (B), carotenoides (C), clorofila total (D) e atividade do fotossistema II, PSII (E) de plântulas de *Solanum lycopersicum* germinadas em diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* (EE: extrato etéreo, EC: extrato clorofórmico e EA: extrato acetônico) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³, e seus aleloquímicos isolados (ácido fumarprotocetrárico: FUM e ácido protocetrárico: PRO) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 18 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p <0,05), médias ± SE, n = 3.134

Figura 3. Valores médios da concentração de clorofila a (A), clorofila b (B), carotenoides (C), clorofila total (D) e atividade do fotossistema II, PSII (E) de plântulas de *Lactuca sativa* germinadas previamente em água e depois transferidas para os diferentes extratos de *Cladonia*

verticillaris (EE: extrato etéreo, EC: extrato clorofórmico e EA: extrato acetônico) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³ e seu aleloquímico ácido fumarprotocetrárico (FUM) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 15 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p <0,05), médias ± SE, n = 3.137

Figura 4. (Valores médios da concentração de clorofila a (A), clorofila b (B), carotenoides (C), clorofila total (D) e atividade do fotossistema II, PSII (E) de plântulas de *Solanum lycopersicum* germinadas previamente em água e depois transferidas para os diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* (EE: extrato etéreo, EC: extrato clorofórmico e EA: extrato acetônico) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³ e seus aleloquímicos isolados (ácido fumarprotocetrárico: FUM e ácido protocetrárico: PRO) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, em duas concentrações, utilizando água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 21 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p <0,05), médias ± SE, n = 3.....138

Figura 5. Valores médios da atividade da peroxidase (A,B), polifenoloxidase (C,D) e catalase (D,E) de folhas de plântulas de *Lactuca sativa* germinadas (A, C e E) ou transferidas após germinadas em água (B, D e F) para os diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* (EE: extrato etéreo, EC: extrato clorofórmico e EA: extrato acetônico) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³ e seu aleloquímico ácido fumarprotocetrárico (FUM) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas das figuras A, C e E foram avaliadas 12 dias após a germinação e as B, D e F 15 dias após a

germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), médias \pm SE, $n = 3$140

Figura 6. Valores médios da atividade da peroxidase (A,B), polifenoloxidase (C,D) e catalase (D,E) de folhas de plântulas de *Solanum lycopersicum* germinadas (A, C e E) ou transferidas após germinadas em água (B, D e F) para os diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* (EE: extrato etéreo, EC: extrato clorofórmico e EA: extrato acetônico) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³ e seu aleloquímico ácido fumarprotocetrárico (FUM) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas das figuras A, C e E foram avaliadas 18 dias após a germinação e as B, D e F 21 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), médias \pm SE, $n = 3$141

Figura 7. Radículas de plântulas de *Lactuca sativa* após dez dias de germinação em diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* (2,5 g.dm⁻³) e posteriormente tratadas com azul de Evans para detecção de morte celular. A e B: controle; C e D: radículas de plântulas crescidas em extrato etéreo; E: radículas de plântulas crescidas em extrato clorofórmico; F-I: radículas de plântulas crescidas em extrato acetônico

Figura 6. Valores médios da atividade da peroxidase (A,B), polifenoloxidase (C,D) e catalase (D,E) de folhas de plântulas de *Solanum lycopersicum* germinadas (A, C e E) ou transferidas após germinadas em água (B, D e F) para os diferentes extratos de *Cladonia verticillaris*.....143

Figura 8. Folhas de plântulas de *Lactuca sativa* após dez dias de germinação em diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* e posteriormente tratadas com azul de Evans para detecção de morte celular. **A:** controle; **B e C:** folhas de plântulas crescidas em extrato etéreo (2,5 g.dm⁻³); **D:** folhas de plântulas crescidas em extrato clorofórmico (2,5 g.dm⁻³); **E:** folhas de plântulas crescidas em extrato

clorofórmico (1,0 g.dm⁻³); **F-G e I:** folhas de plântulas crescidas em extrato acetônico (2,5 g.dm⁻³); **H:** pecíolo de plântulas crescidas em extrato acetônico (2,5 g.dm⁻³).....144

CAPÍTULO 3: EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA NO POTENCIAL ALELOPÁTICO DE *Cladonia verticillaris* SOBRE *Lactuca sativa*

Figura 1. Valores médios da concentração de clorofila a (A-D), clorofila b (E-H) e carotenoides (I-L) em plântulas de *Lactuca sativa* germinadas em diferentes extratos [EE: extrato etéreo (A, E e I), EC: extrato clorofórmico (B, F e J), EA: extrato acetônico (C, G e K) e EM: extrato metanólico (D, H e L)] de *Cladonia verticillaris* irradiada com diferentes doses de radiação gama (doses de 0, 10, 50 e 100 Gy) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³, e seus aleloquímicos isolados (ácido fumarprotocetrárico: FUM e ácido protocetrárico: PRO) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 12 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p <0,05), médias ± SE, n = 3.170

Figura 2. Valores médios da concentração de clorofila total (A-D) e atividade do fotossistema II (E-H) de plântulas de *Lactuca sativa* germinadas em diferentes extratos [EE: extrato etéreo (A, E e I), EC: extrato clorofórmico (B, F e J), EA: extrato acetônico (C, G e K) e EM: extrato metanólico (D, H e L)] de *Cladonia verticillaris* irradiada com diferentes doses de radiação gama (doses de 0, 10, 50 e 100 Gy) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³, e seus aleloquímicos isolados (ácido fumarprotocetrárico: FUM e ácido protocetrárico: PRO) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle

negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 12 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), médias \pm SE, n = 3.171

Figura 3. Valores médios da atividade de peroxidase (A-C), polifenoloxidase (D-F) e catalase (G-I) de folhas de *Lactuca sativa* germinadas em diferentes extratos [EE: extrato etéreo (A, D e G), EC: extrato clorofórmico (B, E e H) e EA: extrato acetônico (C, F e I)] de *Cladonia verticillaris* irradiada com diferentes doses de radiação gama (doses de 0, 10, 50 e 100 Gy) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³, e ácido fumarprotocetrárico (FUM) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 12 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), médias \pm SE, n = 3.....176

Figura 4. Valores médios da concentração de clorofila a (A-C), clorofila b (D-F), carotenoides (G-I), clorofila total (J-L) e atividade do fotossistema II (M-O) de plântulas de *Lactuca sativa* germinadas previamente em água e depois transferidas para os diferentes extratos [EE: extrato etéreo (A, D, G, J e M), EC: extrato clorofórmico (B, E, H, K e N) e EA: extrato acetônico (C, F, I, L e O)] de *Cladonia verticillaris* irradiada com diferentes doses de radiação gama (doses de 0, 10, 50 e 100 Gy) na concentração 1,0 e 2,5 g.dm⁻³, e ácido fumarprotocetrárico (FUM) na concentração 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) na concentração 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 15 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), médias \pm SE, n = 3.....178

Figura 5. Valores médios da atividade de peroxidase (A-C), polifenoloxidase (D-F) e catalase (G-I) de folhas de *Lactuca sativa* germinadas previamente em água e depois transferidas para os diferentes extratos

[EE: extrato etéreo (A, D e G), EC: extrato clorofórmico (B, E e H) e EA: extrato acetônico (C, F e I)] de *Cladonia verticillaris* irradiada com diferentes doses de radiação gama (doses de 0, 10, 50 e 100 Gy) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³, e ácido fumarprotocetrárico (FUM) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 15 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p <0,05), médias ± SE, n = 3180

CAPÍTULO 4: ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. PELA ATIVAÇÃO DA UREASE

Figura 1. Valores médios da germinabilidade total (A), e do tempo médio de germinação, 180 h (B) de aquênios de *Lactuca sativa* submetidas a ação de *Cladonia verticillaris* e suprimento exógeno de ureia nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 g.dm⁻³, utilizando como controle o líquen borrifado com água, ou ureia nas mesmas concentrações sem a presença de *C. verticillaris*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p <0,05), médias ± SE, n = 3.203

Figura 2. Valores médios da área foliar (A, D), do comprimento hipocotilar (B, E) e do comprimento radicular (C, F) de plântulas de *Lactuca sativa* germinadas (A-C) ou transferidas após germinação em água submetidas (D-F) a ação de *Cladonia verticillaris* e suprimento exógeno de ureia nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 g.dm⁻³, utilizando água destilada como controle ou ureia nas mesmas concentrações sem a presença de *C. verticillaris*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p <0,05), médias ± SE, n = 3.204

- Figura 3.** Experimento com *Cladonia verticillaris* com e sem adição de ureia. **B e H.** experimento pré-emergente. **C-G.** Experimento pós-emergente. **A.** Extração do líquen para teste de vitalidade após a instalação do experimento. **B.** Plântulas submetidas ao tratamento com líquen+H₂O_d, **C.** Plântulas tratadas com líquen+ureia 0,1 mg.mL⁻¹, **D.** Plântulas tratadas com líquen+ureia 10 mg.mL⁻¹, **E.** Plântulas tratadas com líquen+ureia 1,0 mg.mL⁻¹, **F.** Plântulas tratadas com ureia 1,0 mg.mL⁻¹, **G.** Plântulas tratadas com ureia 10,0 mg.mL⁻¹. **H.** Plântulas com ureia 1,0 mg.mL⁻¹207
- Figura 4.** Sinais de toxicidade sobre plântulas de *Lactuca sativa* submetidas aos talos de *Cladonia verticillaris* com e sem adição de ureia, comparadas ao controle (H₂O_d). **A-D.** Bioensaio pré-emergente. **E-G.** Bioensaio pós-emergente. **A.** Plântulas submetidas ao tratamento com líquen+H₂O_d, **B.** Plântulas tratadas com líquen+ureia 0,1 mg.mL⁻¹, **C.** Controle, **D.** Plântulas tratadas com líquen+ureia 0,1 mg.mL⁻¹, **E-F.** Plântulas tratadas com líquen+ureia 1,0 mg.mL⁻¹, **G.** Plântulas tratadas com ureia 0,1 mg.mL⁻¹ sem a presença do líquen. (Barra: A-G = 2cm).212
- Figura 5.** Valores médios da massa seca de plântulas de *Lactuca sativa* germinadas previamente em água destilada e depois transferidas para os bioensaios com *Cladonia verticillaris* e suprimento exógeno de ureia nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 g.dm⁻³, utilizando água destilada como controle e ureia nas mesmas concentrações sem a presença de *C. verticillaris*; avaliadas 10 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p <0,05), médias ± SE, n = 3.....214
- Figura 6.** Concentração de ureia no talo e no lixiviado de *Cladonia verticillaris* submetida a suprimento exógeno de ureia na concentração 0,1; 1,0 e 10,0 g.dm⁻³, utilizando água destilada como controle, no terceiro, sexto e nono dia do bioensaio de germinação. Médias ± SE, n = 3.....217

Figura 7. Cromatografia de camada delgada dos extratos dos talos de *Cladonia verticillaris* após dez dias da instalação dos bioensaios (A) e da fração fenólica dos exsudatos (B). HD: Água deionizada; 0,1-10: Concentrações de ureia; PRO: ácido protocetrário; FUM: Ácido fumarprotocetrário; ATR: Atranorina; CV: Extrato do talo natural de *Cladonia verticillaris*.....**218**

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1. Potencialidades pesticidas de metabólitos liquênicos.....46

Tabela 2. Herbicidas desenvolvidos a partir de aleloquímicos naturais54

CAPÍTULO 1: POTENTIAL PHENOLIC BIOHERBICIDES FROM *Cladonia verticillaris* PRODUCE ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN *Lactuca sativa* SEEDLINGS

Tabela 1. Sequential extraction of phenolics from *Cladonia verticillaris* thalli with different organic solvents103

Tabela 2. Main root length and leaf area of lettuce seedlings growing for 10 days on 2.5 mg mL⁻¹ acetonic extract.....106

CAPÍTULO 2: ESTRESSE OXIDATIVO E FOTOSSINTÉTICO DE CÉLULAS DE *Lactuca sativa* E *Solanum lycopersicum* MEDIADOS POR ALELOQUÍMICOS DE *Cladonia verticillaris*

Tabela 2. Análises dos extratos e dos aleloquímicos isolados (FUM- ácido fumarprotocetrárico; PRO – ácido proocetrárico; ATR – atranorina) de *Cladonia verticillaris* submetidos a análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).135

CAPÍTULO 3: EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA NO POTENCIAL ALELOPÁTICO DE *Cladonia verticillaris* SOBRE *Lactuca sativa*

- Tabela 1.** Análises dos extratos e dos aleloquímicos purificados (FUM - ácido fumarprotocetrárico; PRO – ácido proocetrárico; ATR – atranorina) dos talos de *Cladonia verticillaris* submetidos ou não à radiação gama, submetidas a análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), médias \pm SE, n = 3.172
- Tabela 2.** Análises das substâncias detectadas nos extratos de talos de *Cladonia verticillaris* irradiada ou não irradiada com raios gama que foram submetidos a análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), médias \pm SE, n = 3.173

CAPÍTULO 4: ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. PELA ATIVAÇÃO DA UREASE

- Tabela 1.** Avaliação das plântulas quanto à fitotoxicidade de *Cladonia verticillaris* sob *Lactuca sativa* quando submetidas a água deionizada e doses crescentes de ureia (0,1; 1,0 e 10,0 g.dm⁻³), mais o controle (0%).208
- Tabela 2.** Quantificação dos compostos fenólicos do lixiviado de *Cladonia verticillaris*, submetida a ureia exógena (0; 0,1; 1,0 e 10,0 g.dm⁻³), no terceiro, sexto e nono dia do experimento.209
- Tabela 3.** Quantificação dos compostos fenólicos dos extratos do talo de *Cladonia verticillaris*, submetida a ureia exógena (0; 0,1; 1,0 e 10,0 g.dm⁻³), no terceiro, sexto e nono dia do experimento.210

Tabela 4. Valores de pH da ureia e da água destilada antes da instalação dos bioensaios e dos exsudatos após 10 dias de experimento.....**215**

Tabela 5. Rendimentos dos extratos do talo e do lixiviado de *Cladonia verticillaris* submetida a ureia exógena (0; 0,1; 1,0 e 10,0 g.dm⁻³) no terceiro, sexto e nono dia do experimento.**216**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IAS	Sociedade internacional de alelopatia
UV	Radiação ultravioleta
PSII	Fotossistema II
FMA	Fungos micorrizícos arbusculares
PQ	Plastoquinona
QbH2	Plastohidroquinona
PSI	Fotossistema I
QA e QB	Proteínas ligadas à plastoquinona
EROs e ROS	Espécies reativas de oxigênio
$O_2^{\bullet -}$	Superóxido
1O_2	Oxigênio singlete
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
OH^{\bullet}	Radical Hidroxilo
Nr	Nitrogênio reativo
N	Nitrogênio
NH_3	Amônia
NH_4^+	Amônio
FUM	Ácido fumarprotocetrárico
PRO	Ácido protocetrárico
ATR	Atranorina
HIPO	Ácido hipoprotocetrárico
CCD	Cromatografia de camada delgada
CLAE / HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
PEG	Polietilenoglicol
DMSO	Dimetilsufóxido
EMS	Etilmetanosulfonato
PBS	Tampão fosfato sódio
AE / EA	Extrato acetônico
EE	Extrato etéreo
EC / CE	Extrato clorofórmico

EM / ME	Extrato metanólico
TGN	Rede trans-Golgi
HC	Herbicida clortoluron
CTRL	Controle negativo (água)
DCPIP	2,6-diclorfenol indofenol
ELC	Extrato livres de células
TCA	Ácido tricloroacético
TFS	Tampão fosfato de sódio
PPO	Enzima polifenoxidase
PDO	Enzima peroxidase
CAT	Enzima catalase
ANOVA	Análise de variância
Chl	Clorofila
Car	Carotenoide
T _R / I _f	Tempo de retenção
SNI	Substância não identificada
BOA	2(3H)-benzo-oxazolinoni
DAM	Diacetilmonoaxima
MCP	Morte celular programada

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	31
------------------------------	----

2. REFERENCIAL TEÓRICO

PARTE I

2.1 Alelopatia-----	35
---------------------	----

2.2 Líquen- -----	39
-------------------	----

2.2.1 Papel Ecofisiológico das Substâncias Liquênicas -----	42
---	----

2.2.2 Potencial Alelopático dos Líquens -----	44
---	----

2.2.3 Uso de Líquens em Estudos de Alelopatia no Brasil-----	48
--	----

2.3 Aplicações da Alelopatia como Modelos Agroquímicos -----	52
--	----

PARTE II

2.4 Mecanismos de ação dos Herbicidas -----	56
---	----

2.4.1 Inibidores do Fotossistema (PSII) -----	56
---	----

2.4.2 Indutores de Estresse Oxidativo-----	59
--	----

2.5 Metabolismo do nitrogênio na fisiologia dos líquens -----	61
---	----

2.6 <i>Cladonia verticillaris</i> -----	63
---	----

2.6.1 Ácido Fumarprotocetrárico -----	64
---------------------------------------	----

PARTE III

2.7 Procedimentos metodológicos -----	69
---------------------------------------	----

2.7.1 Extração, Identificação, Isolamento e purificação de substâncias -----	70
2.7.2 Características físico-químicas -----	71
2.7.3 Bioensaios -----	71
2.7.4 Interpretação dos resultados e perspectivas -----	73
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	76

CAPÍTULO 1

Potential phenolic bioherbicides from <i>Cladonia verticillaris</i> produce ultrastructural changes in <i>Lactuca sativa</i> seedlings	98
--	----

CAPÍTULO 2

Estresse oxidativo e fotossintético de células de <i>Lactuca sativa</i> e <i>Solanum lycopersicum</i> mediados por aleloquímicos de <i>Cladonia verticillaris</i>	123
---	-----

CAPÍTULO 3

Efeito da radiação gama no potencial alelopático de <i>Cladonia verticillaris</i> sobre <i>Lactuca sativa</i>	159
---	-----

CAPÍTULO 4

Atividade Alelopática de <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr. pela ativação da urease	194
--	-----

CONCLUSÕES.....	229
------------------------	------------

ANEXOS	230
---------------------	------------



Apresentação

1. APRESENTAÇÃO

Alguns organismos competem por luz, água e nutrientes, revelando uma concorrência constante entre as espécies que vivem em comunidade. Essa concorrência contribui para a sobrevivência das espécies no ecossistema, e algumas desenvolvem mecanismos de defesa que se baseiam na síntese de metabólitos, liberados no ambiente e que irão interferir em alguma etapa do ciclo de vida de outro organismo (Sampietro, 2001). No entanto, a natureza não é somente competição, concorrência, redução, mas é também cooperação e diferenciação das comunidades naturais. Muitas interações comportamentais de ataque e defesa não envolvem força física, mas agentes químicos sobre os quais se baseia o tema da nova e rápida expansão do setor da ecologia química – Alelopatia.

A alelopatia é um tipo de interação bioquímica entre as espécies, considerada uma forma de adaptação química defensiva (Soriano, 2001), além de ser um fator de estresse ambiental para muitas espécies (Lovett & Ryuntyu, 1992). Os aleloquímicos, substâncias químicas que atuam nessa interação, podem ter origem no metabolismo primário, mas em sua maioria são provenientes do metabolismo secundário. Segundo Medeiros (1990), as principais vias de liberação de substâncias metabólicas potencialmente envolvidas na alelopatia, são: decomposição, exsudação de metabólitos, lixiviação e volatilização.

Geralmente, a alelopatia resulta da ação de vários aleloquímicos em conjunto, sendo que essas misturas podem conter substâncias similares ou de natureza química diversa (Einhellig, 1999). Estas substâncias orgânicas são responsáveis por uma grande diversidade de efeitos nas plantas, como atraso ou inibição completa da germinação de sementes, paralisação do crescimento, danos ao sistema radicular, clorose, murcha e morte das plantas (Correia, 2002), podendo produzir mais do que um efeito sobre os processos celulares responsáveis pela redução ou estímulo do crescimento da planta. No entanto, os pormenores do mecanismo bioquímico por meio do qual um composto particular exerce um efeito tóxico sobre o crescimento vegetal não são bem conhecidos. Na maioria dos casos, os aleloquímicos dessas misturas não são capazes de causar efeito sobre a planta-alvo quando sozinhos, uma vez que são liberados em pequenas quantidades em condições naturais (Einhellig, 1999; Reigosa *et al.*, 1999). Os sintomas que se observam na planta atingida são determinados pelo conjunto dos efeitos

produzidos pelos aleloquímicos absorvidos pela planta-alvo, tornando-se difícil mesmo depois de identificados os aleloquímicos, estabelecer qual deles provoca os sintomas observados (Almeida, 1988; Durigan & Almeida, 1993). A quantidade e a composição destes aleloquímicos podem variar com a espécie estudada (Putnam, 1985), pois o potencial alelopático de uma espécie depende do genótipo, do seu estágio de desenvolvimento, das condições ambientais e situações de estresse (Rice, 1984).

O modo de ação dos aleloquímicos pode ser mensurado em sistemas isolados, porém a questão crítica de que a inibição alcançada no local da planta está em concentração suficiente para influenciar especificamente a reação em estudo, e se outro processo pode ser afetado mais rapidamente sempre continua. A maior dificuldade de esclarecer esses mecanismos é a separação dos efeitos secundários das causas primárias (Putnam, 1985). Para Souza-Filho & Alves (2002), um dos fatores que dificulta a compreensão nas interações entre efeito e causa dos aleloquímicos é o fato de uma mesma substância afetar diferentes funções fisiológicas da planta, assim como uma mesma função pode ser afetada por mais de um composto.

Vários aleloquímicos podem ser seletivos em suas ações e as plantas podem ser seletivas em suas respostas. Por este motivo, torna-se difícil sintetizar o modo de ação destes compostos (Seigler, 1996), levando muitos estudos a se restringirem apenas a modificações na germinação e nos padrões de crescimento da planta-teste, sem considerar os eventos celulares relacionados às mudanças fisiológicas.

A crescente consciência sobre os problemas ambientais e de saúde pública, ligados ao uso excessivo de produtos agroquímicos, tem estimulado o interesse na busca de novos herbicidas seletivos, facilmente degradáveis e ambientalmente seguros. Nesse contexto, a capacidade que os aleloquímicos possuem para inibir/estimular eficazmente o desenvolvimento de vegetais sugere que eles possam ser utilizados como herbicidas/fitorreguladores.

Semelhantes a alguns herbicidas comerciais, os aleloquímicos são capazes de inibir a fotossíntese (Lotina-Hensen *et al.*, 1992; King-Diaz *et al.*, 2001) e promover estresse oxidativo nas plantas receptoras, aumentando a atividade das enzimas antioxidantes (Pandey *et al.*, 2005), ou inibindo a oxidação dessas enzimas, deixando a planta vulnerável a danos oxidativos (Vivanco *et al.*, 2004). O teor dos pigmentos

fotossintéticos também indica o nível do dano que o estresse aleloquímico pode estar causando à planta. Nas situações de estresse por herbicidas, as clorofilas totais são destruídas com maior intensidade que os carotenóides, uma vez que esses pigmentos estão relacionados com a defesa da planta (Hendry *et al.*, 1987).

Os líquens ou fungos liquenizados possuem grande relevância econômica, constituída pelo uso de substâncias com eficiente atividade biológica, como atividade alelopática, farmacológica, antineoplásica, antimicrobiana, entre outros (Xavier *et al.*, 2006). Tais substâncias são quase na sua totalidade de natureza fenólica (Hale, 1983). Como nos demais organismos alelopáticos, os compostos liquênicos são regulados por diversos fatores bióticos e abióticos, modificando diretamente sua taxa de produção. Além disso, por se alimentarem de forma higroscópica, esses organismos simbiotes captam e fixam os elementos do ar para seu metabolismo. Dentre esses elementos está o nitrogênio que largamente é utilizada nos fertilizantes, e indispensável para síntese dos aminoácidos (Syrett, 1962) que são usados na biossíntese de fenóis (Blanco *et al.*, 1984). Dessa forma, a ação antrópica através do uso de fertilizantes pode influenciar na síntese de compostos bioativos, porém o uso indiscriminado desses produtos pode causar sérios riscos ecológicos como eutrofização regional, acidificação e diminuição da diversidade vegetal e liquênica (Brown, 1992; Gao *et al.*, 2007).

Estudos realizados através da aplicação de extratos brutos e substâncias puras de vários líquens da família Cladoniaceae, ocorrentes em tabuleiros arenosos do Nordeste do Brasil, revelaram que estes simbiotes interferem na germinação de sementes de vegetais superiores, como observado por Oliveira *et al.* (1991) e Tigre *et al.* (2012), interagem com fungos micorrízicos arbusculares do solo, influenciando no desenvolvimento de sementes e plântulas de *Genipa americana* nativas destes ecossistemas onde ocorrem tais espécies e modificam a composição química do solo subjacente (Silva, 2007; Vasconcelos, 2007). Por isso, este estudo teve como objetivo avaliar a ação de metabólitos de *Cladonia verticillaris* sobre a atividade do fotossistema II e do sistema antioxidativo durante o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* e *Solanum lycopersicum* como contribuição ao conhecimento da dinâmica de ecossistemas onde líquens terrícolas ocorram e, sua influência no funcionamento e estrutura destes ambientes, bem como uma alternativa para prospecção de fitorreguladores ou herbicidas naturais.

Referencial Teórico

Parte I

Publicado como capítulo intitulado: Potencial Alelopático das Substâncias liquênicas. In: A liquenologia Brasileira no Início do século XXI.

Tigre, R.C.; Rodrigues, B.R.M. Potencial alelopático das substâncias liquênicas. 2012. Pp. 87-106. *In*: Pereira, E.C.; Mota-Filho, F.O.; Martins, M.C.B.; Buriel, M.L.L.; Rodrigues, B.R.M. (Org.). **A liquenologia brasileira no início do século XXI**. Recife, CSS Gráfica e Editora Comércio e Representação Ltda – EPP.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Alelopatia

O conhecimento de que as plantas têm a capacidade de interferir no desenvolvimento de outras plantas através de substâncias liberadas para o meio remonta à antiguidade. Os primeiros registros foram observados por Demócrito (500 a.C) e Theophrastus (300 a.C), os quais expuseram que *Cicer arietinum* exauria o solo e inibia a vegetação (Rice, 1984). Posteriormente, De Candolle em 1832 expôs que o “cansaço das terras” era decorrente do acúmulo de produtos químicos exsudados pelas monoculturas durante anos seguidos, o qual passava a afetar o seu próprio desenvolvimento. Porém, a primeira demonstração científica da alelopatia foi realizada por Schreiner & Sullivan (1909), que provaram que a redução no desenvolvimento de *Vigna unguiculata* acontecia devido à presença de compostos químicos.

O termo alelopatia foi criado por Hans Molisch, em 1937, pela união das palavras gregas *allelon* (mútuo) e *pathos* (prejuízo) e segundo ele, “*alelopatia é a capacidade das plantas superiores ou inferiores e micro-organismos produzirem substâncias químicas que, liberadas no ambiente de outras, influenciam de forma favorável ou desfavorável o seu desenvolvimento*”. Alguns autores consideram que o conceito abrange apenas os efeitos inibitórios (Putnam, 1985; Boyette & Abbas, 1995), outros ainda excluem micro-organismos a partir da definição (Putnam & Duke, 1978; Putnam, 1985; Pratley, 1996). No entanto, muitos produtos químicos inibitórios produzidos pelas plantas estimulam o crescimento em baixas concentrações (Liu & Lovett, 1993; Pratley, 1996), e micro-organismos também podem mediar alelopatia (Rice, 1992; Bremner & McCarty, 1993). Assim, em 1996, a sociedade internacional de alelopatia (IAS) ampliou a definição aos processos que envolvem a liberação de metabólitos primários e secundários por plantas, líquens, micro-organismos, vírus e fungos que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos.

Desde 1980, a ciência da alelopatia tem atraído um grande número de cientistas de diversas áreas, aumentando também o número de trabalhos neste campo (Kohli *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2001).

Apesar de haver grande discordância entre alguns autores quanto à alelopatia e competição, o diferencial é que a alelopatia envolve a adição de um produto químico ao ambiente. Já a competição envolve o uso compartilhado de algum fator necessário para limitar o crescimento (Muller, 1969; Rice, 1984; Alves, 1992). Contudo, na natureza, é difícil distinguir e identificar os efeitos individuais devido à complexidade biológica dos processos e, por eles ocorrerem simultaneamente ou sequencialmente (Durigan & Almeida, 1993; Souza Filho & Alves, 2002; Dakshini *et al.*, 1999; Hoagland & Williams, 2004).

A maioria das substâncias chamadas genericamente de aleloquímicos provém do metabolismo secundário (Whittaker & Feeney, 1971; Rice, 1984; Rizvi *et al.*, 1992) e é liberada para o meio por volatilização, lixiviação, decomposição de resíduos e exsudados. Estes produtos podem interferir no padrão de crescimento e desenvolvimento da vegetação adjacente (Ferreira & Borguetti, 2004). Inicialmente, o motivo pelo qual os organismos destinam recursos para a produção destes compostos não era entendido, e foram considerados resíduos sem função (Mothes, 1955). Contudo, com os avanços na Química de Produtos Naturais, diferenças qualitativas e quantitativas entre esses compostos têm-se tornado evidentes e explicam a função deles nos processos ecológicos naturais (Siqueira *et al.*, 1991). Sabe-se também que esses aleloquímicos representam função de proteção (Lovett *et al.*, 1982), pois durante o longo processo de evolução, estes organismos adquiriram capacidade de sintetizar, armazenar e excretar uma variedade desses metabólitos que representaram vantagem contra a ação de micro-organismos, vírus, insetos, e outros patógenos ou predadores, seja inibindo a ação destes ou estimulando o crescimento e desenvolvimento (Waller, 1999). Esses compostos podem ser considerados como parte de uma rede de comunicação química entre os organismos (Gniazdowska & Bogatek, 2005), que são armazenados em vacúolos (Chou, 1989; Gershenzon, 1993) ou podem ser ligados a açúcares como glicosídeos ou ocorrer como polímeros e cristais tornando-os ineficazes contra o doador (Whittaker & Feeney, 1971). Alternativamente, estas substâncias podem ser lançadas ao solo e se tornarem ativas após serem degradadas por micro-organismos (Putnam, 1985).

A alelopatia é um fenômeno dependente da concentração e os aleloquímicos são introduzidos no ambiente juntamente com um vasto número de outros metabólitos

secundários. Assim, é provável que os efeitos sinérgicos melhorem as atividades observadas (Putnam & Tang, 1986).

Fatores relacionados ao estresse abiótico, como temperatura, intensidade luminosa, radiação ultravioleta, disponibilidade de água e nutrientes, textura do solo e presença de micro-organismos podem modificar diretamente a taxa de produção dos aleloquímicos e, conseqüentemente, sua atividade biológica (Einhellig, 1996; Kong *et al.*, 2002; Taiz & Zeiger, 2004). A ação desses compostos envolve interação entre estresses abióticos e bióticos que pode também só atuar quando em presença de outros (relações sinérgicas), em combinações e proporções específicas que potencializam suas ações (Almeida, 1990; Einhellig, 1999).

Há uma enorme diversidade de grupamentos químicos e sua classificação é baseada na estrutura, origem e propriedades químicas que podem ser os responsáveis pelos efeitos alelopáticos observados entre os organismos. Estes efeitos resultam da ação combinada dos grupos de aleloquímicos que, coletivamente, interferem em vários processos fisiológicos (Rice, 1984; Putnan & Tang, 1986; Inderjit & Dakshini, 1995; Chou, 1999; Reigosa *et al.*, 1999; Einhellig, 2002), podendo apresentar ação direta ou indireta sobre o indivíduo alvo (Molisch, 1937). Os efeitos indiretos são evidenciados pelas alterações nas propriedades e características nutricionais do solo e também nas populações e/ou atividade de organismos que nesta habitam. Os efeitos diretos são mais estudados e compreendem o atraso ou a inibição completa da germinação de sementes, paralisação do crescimento, danos ao sistema radicular, clorose, murcha e morte das plantas. Estes efeitos visuais dos aleloquímicos sobre as plantas são apenas sinalizações secundárias de mudanças anteriores como alterações celulares e metabólicas, incluindo modificações no funcionamento de membranas, na absorção de nutrientes e de água, na atividade fotossintética e respiratória, entre outras (Rice, 1984; Rizvi & Rizvi, 1992; Reigosa *et al.*, 1999; Ferreira & Áquila, 2000; Inderjit & Weiner, 2001; Pedrol *et al.*, 2006). Dentre os estudos das alterações ocasionadas pelos aleloquímicos, podem-se citar: mudanças nas taxas fotossintéticas (Baziramakenga *et al.*, 1994), funcionamento dos estômatos (Einhellig & Kuan, 1971), teor de clorofila (Einhellig & Rasmussen, 1979), taxa respiratória (Van sumere *et al.*, 1971; Peñuelas *et al.*, 1996; Carmo *et al.*, 2007), fluxo do carbono (Danks *et al.*, 1975), captação de minerais (Glass, 1973; Harpe & Balke, 1981), permeabilidade da

membrana e funções de ATP-ase (Glass & Dunlop, 1974; Friebe *et al.*, 1997), divisão celular (Muller 1965; Campanella *et al.* 2002); alongamento celular (Jankay & Muller, 1976); estrutura celular (Lorber & Muller, 1976); parede celular (Zobel & Lynch, 1997); síntese de proteínas e ácidos nucleicos (Seigler, 1996; Vyvyan, 2002).

A fisiologia da ação aleloquímica é um dos mais desafiadores temas em alelopatia. Esta ação pode ser mensurada em sistemas isolados, porém a questão crítica é se a inibição alcançada no local da planta está em concentração suficiente para influenciar especificamente a reação em estudo, e se outro processo pode ser afetado mais rapidamente. A maior dificuldade no esclarecimento desses mecanismos é a separação dos efeitos secundários das causas primárias (Putnam, 1985). Um dos fatores que dificulta a compreensão nas interações entre causa e efeito é o fato de uma mesma substância afetar diferentes funções fisiológicas nas plantas, assim como uma mesma função pode ser afetada por mais de um composto (Souza-Filho & Alves, 2002; Pedrol *et al.*, 2006; Lotina-Hennsen *et al.*, 2006; Dayan & Duke, 2006). A expansão da biotecnologia e da genômica funcional deve proporcionar informações fisiológicas relevantes para determinar os mecanismos específicos de ação de muitos aleloquímicos, como também diferenças nas respostas entre as espécies (Pedrol *et al.*, 2006). Inderjit & Weston (2000) descreveram alguns requisitos para demonstração das interações alelopáticas: 1. Componente ecológico – demonstrando que a interferência ocorre na natureza; 2. Componente químico – identificação, isolamento e caracterização dos aleloquímicos envolvidos; 3. Componente fisiológico – identificação do mecanismo de interferência ao nível bioquímico, fisiológico, celular e molecular.

A alelopatia também pode ser explorada para o controle de insetos nocivos (Anaya, 1999) que os detém agindo como venenos metabólicos ou como dissuasores alimentares (Brattsten, 1986). Assim, os aleloquímicos podem atuar como um impedimento da oviposição, repelente retardador de crescimento, dissuasores alimentares, entre outras (Schumutterer, 1995). Surpreendentemente, é relativamente não tóxico para animais de sangue quente, incluindo os seres humanos.

2.2 Líquen

Os líquens são uma associação estável e auto-sustentável entre os fungos (micobiontes) e algas fotoautotróficas e/ou cianobactérias (fotobiontes). As interações dentro dos talos liquênicos são complexas e estes organismos podem ser considerados mais como um ecossistema ou uma comunidade, do que um organismo típico (Fahselt, 2008).

Os líquens tipicamente consistem de camadas de tecidos (Fig. 1), geralmente incluindo (1) espessas camadas corticais superiores e inferiores protegidas por massas de hifas fúngicas, (2) uma fina camada de células fotobiônicas sob o córtex superior e (3) uma massa entrelaçada de hifas medulares centrais que suportam a camada fotobiônica e facilitam as trocas gasosas. As células fotobiônicas normalmente representam menos de 10% da massa total do talo, estando posicionadas de maneira a otimizar a fotossíntese, uma vez que representam a única fonte de fixar carbono para ambos os parceiros. Contudo, ainda existe uma grande variação morfológica entre os líquens, que se baseia em modificações derivadas do fungo como requisitos para a fotossíntese. As associações de muitos líquens primitivos incrustantes são consideradas provavelmente os melhores exemplos de parasitismo controlado, já que frequentemente resultam em danos ao fotobionte. Tecnicamente, uma vez que todos os fotobiontes liquênicos são hospedeiros nutricionais para o parceiro fúngico, que é mais dominante, a associação em certa medida é sempre parasitária (Lawrey, 2009).

Mesmo filogeneticamente diferentes, espécies de fungos que formam líquens se comportam de modo similar durante a liquenização, criando organismos simbióticos que são notavelmente similares ecofisiologicamente e quimicamente. É impossível ignorar as características quase universais e a definição simbiótica de líquens como acidentes aleatórios. A transição para um estado liquenizado cria problemas fisiológicos não enfrentados por um fungo aposimbiótico (Lawrey, 2009).

Os líquens produzem cerca de 1050 compostos secundários que são exclusivos para a simbiose (Stocker-Wörgötter, 2008). Alguns, aproximadamente 10%, ocorrem em outros fungos ou em vegetais superiores (Elix, 1996; Huneck & Yoshimura, 1996; Huneck, 2001). Dentre esses, até cinco compostos podem estar presentes em cada espécie de líquen. A síntese desses compostos é baseada em fotossintatos entregues a

partir do fotobionte (Solhaug & Gauslaa, 2004; McEvoy *et al.*, 2006) que resultam no metabolismo secundário do componente fúngico e são depositados como cristais pouco solúveis em água na superfície externa das hifas, em vez de compartimentada nas células (Fahselt & Hageman, 1994; Honegger, 1998). Esses cristais podem ser extraídos com solventes orgânicos, em alguns casos, sem prejudicar a função metabólica dos simbiontes (Solhaug & Gauslaa, 2001). Certos compostos podem ser depositados apenas nos tecidos corticais, diretamente na superfície das células fotobiônicas (Sarret *et al.*, 1998), enquanto outros se limitam a tecidos internos medulares, ou em específicas estruturas vegetativas e reprodutivas. Portanto, líquens com altas concentrações de compostos secundários, necessariamente, investem uma quantidade significativa de carbono para a síntese dessas substâncias. Sendo assim, possivelmente a respiração do micobionte está diretamente regulada pelo processo fotossintético do fotobionte (Palmqvist *et al.*, 2002).

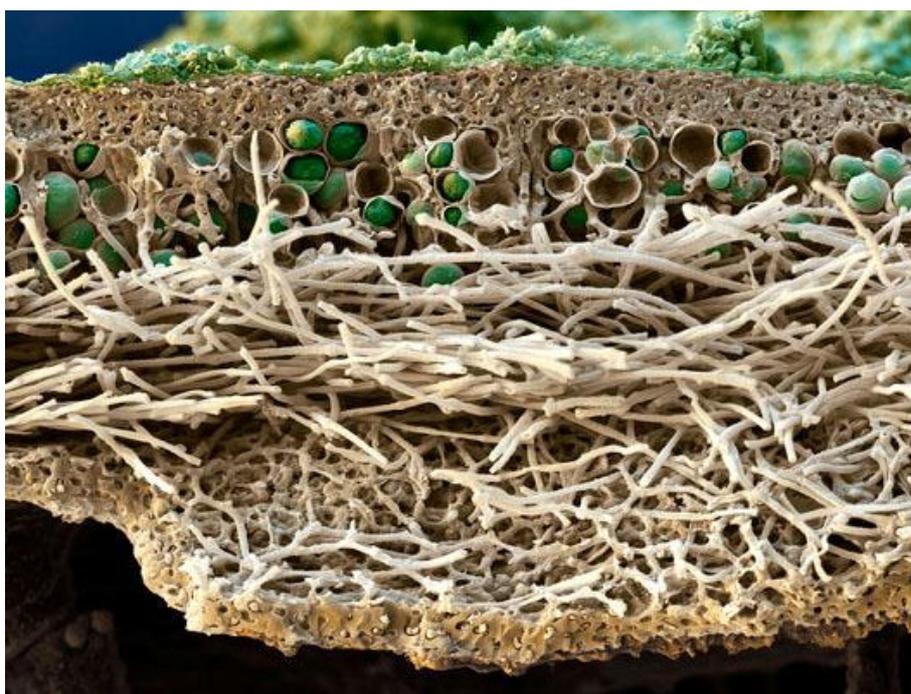


Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura de uma seção transversal de *Parmelia sulcata*. Visualização da associação simbiótica de um fungo (estruturas tubulares finas) e uma alga (esferas verdes). Ampliação: 480 X. (Fonte: Eye of science/science photo library).

A biossíntese dos compostos liquênicos é análoga aos processos que ocorrem em fungos não liquenizados. Fotobiontes aparentemente não são necessários para a síntese, mas a maioria dos compostos é produzida apenas por micobiontes liquenizados, e alguns micobiontes isolados produzem compostos diferentes do fungo em associação (Ahmadjian, 1993), todos os quais sugerem a presença do fotobionte para criar as condições necessárias para a síntese adequada de muitas substâncias (Lawrey, 2009). Compostos liquênicos provavelmente desempenham importantes papéis fisiológicos na regulação da simbiose liquênica (Honegger, 1991, 1992, 1998), mas segundo Lawrey (2009) se elas fossem essenciais para a origem e manutenção do estado de simbiose, seria uma evidência mais forte.

A maioria das substâncias liquênicas é derivada de ácidos fenólicos da via do acetato-polimalonato, incluindo depsídeos, depsidonas, ácidos fenólicos, ácidos alifáticos, dibenzofuranos, ésteres, cromonas, xantonas, antraquinonas e naftoquinonas. Um número menor é derivado da via do ácido mevalônico, incluindo carotenóides e triterpenóides e rota do ácido chiquímico, inclusive de pigmentos amarelos derivados do ácido pulvínico (Culberson & Elix, 1989; Crittenden & Porter, 1991; Fahselt, 1994; Elix, 1996; Huneck & Yoshimura, 1996; Honda & Vilegas, 1998; Huneck, 1999) e todas essas substâncias têm relativamente baixo peso molecular (Turk *et al.*, 2003).

As concentrações dos compostos liquênicos variam nos talos, principalmente em tecidos de diferentes idades, mas normalmente variam de 1-5% em peso seco do talo, podendo chegar até 20% (Huneck, 1973; Fahselt, 1996; Honda & Vilegas, 1998). Embora o teor de 5-10% seja mais comum, eles devem ter um papel importante na ecologia dos líquens como proteção contra fatores bióticos, como herbivoria (Slansky, 1979) e competição ou fatores abióticos, tais como luz UV (Fahselt, 1996). Portanto, é possível que esses metabólitos secundários sejam responsáveis pelo o sucesso ecológico da liquenização, permitindo frequentemente que os líquens sejam os organismos dominantes em ambientes caracterizados por condições ecológicas extremas (Bačkor *et al.*, 2010). Assim, as espécies que sintetizam mais produtos secundários são aquelas capazes de crescer nesses ambientes severos, tais como aqueles com suprimentos limitados de nutrientes ou com alto teor de nitrogênio e fósforo (Fahselt, 1996). Contudo, a quantidade de metabólitos secundários produzidos pelos talos depende de numerosos fatores, como o balanço de carbono

(Hyvarinen *et al.*, 2003), a radiação UV (BeGora & Fahselt, 2001; Bjerke *et al.*, 2002), estresse oxidativo (Caviglia *et al.*, 2001), teor de água e sazonalidade (Taguchi *et al.*, 1969).

Como consequência, funções ecofisiológicas têm sido propostas para estes compostos. Entre elas estão: reguladores das relações internas de água (Lange *et al.*, 1997; Honegger, 1998; Blanco *et al.*, 1984; Vicente, 1985; Legaz & Vicente, 1989; Perez-Urria & Vicente, 1989), reguladores do metabolismo do fotobionte (Follmann & Villagrán, 1965; Kinraide & Ahmadjian, 1970; Honegger, 1987), mineralização de elementos essenciais (Schatz, 1962; Syers & Iskandar, 1973; Purvis *et al.*, 1987, 1990; Jones, 1988), fotoproteção (Fahselt & Hogeman, 1994), agentes alelopáticos (Lawrey, 1995; 2009), defesa de patógenos e predadores (Huneck 1999; Lawrey, 1984, 1986; Manojlovic *et al.*, 2002; Gauslaa, 2005; Pöykkö *et al.*, 2005) e resposta ao estresse induzido (Lawrey, 2009).

Substâncias liquênicas podem ser potencialmente tóxicas para células que entram em contato direto com elas, até mesmo para algas do líquen que o produz (Bačkor *et al.*, 2010). Menor toxicidade dessas substâncias para as células do fotobionte pode ser resultado de co-evolução de fotobiontes do gênero *Trebouxia* com fungos filamentosos durante um longo período de tempo, talvez centenas de milhões de anos (Yuan *et al.*, 2005; Bačkor *et al.*, 2010).

2.2.1 Papel Ecofisiológico das Substâncias Liquênicas

Líquens são organismos comuns na sucessão primária que preparam uma paisagem anteriormente inadequada para plantas e outros organismos explorarem (Dayan *et al.*, 2001). Muitas dessas espécies sintetizam substâncias com algum grau de atividade antimicrobiana, que pode estar relacionada com a função ecológica desses organismos em geral e/ou na dinâmica do ecossistema. A atividade antimicrobiana, no entanto, parece não estar relacionada com outros papéis ecológicos, como herbivoria (Lawrey, 1995).

Os fungos que formam líquens produzem antibióticos de metabólitos secundários que oferecem proteção contra a maioria dos animais e de micro-organismos

patogênicos (Vartia, 1973; Rundel, 1978; Lawrey, 1984, 1986). No entanto, alguns animais obrigatórios fungívoros (Lawrey, 1983) e parasitas fúngicos (Lawrey, 1995) consomem líquens, o que sugere que a tolerância a certos compostos liquênicos pode desempenhar um papel na ecologia desses organismos. O fato de muitos destes compostos absorverem fortemente a radiação na faixa UV, principalmente UV-B e UV-C, sugere que eles podem também desempenhar um papel como telas de proteção, mesmo na medula (Fahselt & Hageman, 1994). Contudo, produção de compostos fotoprotetores corticais por talos liquenizados parece ser sensível às mudanças em condições luminosas. Esses organismos possuem potencial para reagir quimicamente às mudanças em seu ambiente. Essa flexibilidade na produção de compostos é altamente adaptável a uma longa vida, porém os organismos tolerantes ao estresse enfrentam uma variedade de ameaças imprevisíveis (Lawrey, 2009). Dessa forma, Lange (1992) expressa a hipótese de que os compostos liquênicos são "*generalizadas adaptações à vida em ambientes extremos*" essencialmente para defender o par simbiótico de estresses abióticos e bióticos. Isso corrobora com a hipótese de que a defesa química é induzida por estresse e não para qualquer tipo de ameaça especial. Mesmo ações antropogênicas, como a poluição do ar, podem provocar alterações na química destes organismos. Por exemplo, Białonska & Dayan (2005) observaram que as concentrações de ácido fisodálico aumentaram significativamente em talos de *Hypogymnia physodes* transplantadas para ambientes não poluídos oriundas de ambientes poluídos. Um estudo posterior (Hauck & Huneck, 2007a) confirmou que o ácido fisodálico pode agregar metais prejudiciais à parede celular de fungos, o que impede sua entrada nas células. Ácido fumarprotocetrárico parece igualmente fornecer a proteção de metais em *Lecanora conizaeoides* tolerante à poluição (Hauck & Huneck, 2007b). O aumento na produção de compostos liquênicos nestas situações não é provavelmente desencadeado especificamente pela poluição, mas sim representa uma resposta ao estresse que é claramente adaptativo. Os mecanismos reais pelos quais tais respostas são induzidas continuam a ser descobertos, mas parece haver evidências de várias fontes que a produção de composto é uma das respostas ao estresse em muitos líquens.

O estudo realizado por McEvoy *et al.* (2007) demonstrou que as concentrações de sete depsídonas medulares de *Lobaria pulmonaria* permaneceram inalteradas ao longo de gradientes de luz, mas melaninas corticais responderam significativamente à alteração das condições de luz. Os autores concluíram que tais respostas sugerem um

papel fotoprotetor para as substâncias corticais e um papel antiherbivoria para as substâncias medulares. Giez *et al.* (1994) sugerem que o ácido fumarprotocetrárico, composto medular, seja anti-herbívoro, mas Nybakken & Julkunen-Tiitto (2006) não encontraram estudos testando essa hipótese.

2.2.2 Potencial Alelopático dos Líquens

A penetração de hifas de líquens em tecidos de briófitas e plantas vasculares foi observada no início dos estudos liquenológicos, sugerindo relações parasitárias (Fink, 1913; Zukal, 1879) e justificando a prática de alguns proprietários de pomares na Europa e América do Norte que aplicavam biocidas para erradicar sua presença nos troncos (Hale, 1967).

Metabólitos secundários de líquens possuem efeitos alelopáticos sobre briófitas e plantas vasculares que têm sido extensivamente estudados focando a inibição da germinação dos esporos e sementes, subordinadamente, de outros estágios de crescimento (Lawrey, 1984, 1986). Pesquisas têm estudado os efeitos de metabólitos liquênicos terrícolas em plantas para explicar a competição pela superfície do solo, e como os efeitos de líquens corticosos atuam sobre a saúde de seus forófitos. Como no caso de interações planta-planta (Inderjit *et al.*, 2005), interferências alelopáticas de líquen têm sido principalmente observadas *in vitro*, quando poucos exemplos têm sido relatados em ambientes naturais.

McWhorter (1921) e Heilman & Sharp (1963) mostraram em seus estudos de campo que talos liquênicos podem levar à destruição e inibição do crescimento de briófitas. Compostos extraídos de espécies de *Cladonia*, como ácido úsnico, inibem a germinação de esporos de várias espécies de musgos às várias extensões (Lawrey, 1977; Giordano *et al.*, 1999; Glime, 2007). Efeitos tóxicos de oito compostos liquênicos foram observados sobre esporos de *Funaria hygrometrica* reduzindo a porcentagem de germinação e crescimento, sendo a toxicidade relativa dos diferentes compostos dependente do pH, sendo o ácido vulpínico sendo o mais tóxico de todos os pH testados (Gardner & Mueller, 1981). Alguns metabólitos de *Cladonia foliacea*, por exemplo, arabitol e manitol, exercem um efeito estimulante sobre o crescimento de

musgo. Segundo Giordano *et al.* (1999), isso também pode explicar o aumento do desenvolvimento de gametófitos cultivados com *C. foliacea* na sequência de uma inibição inicial, durante as duas primeiras semanas, associada às alterações citológicas (aparência granular do citoplasma e alterações na forma do cloroplasto).

Alguns líquens epífitos, como *Parmotrema tinctorum* e *Parmotrema rigidum*, aceleram a colonização por epífitas, como *Tillandsia* (Bromeliaceae) em seus hospedeiros mais comuns (*Quercus virginiana*) e aumentam o número de sementes que aderem ao tronco de outras árvores hospedeiras incomuns (Callaway *et al.*, 2001). No entanto, extratos de líquens de espécies de *Cladonia* e *Peltigera canina*, têm sido demonstrados, *in vitro*, para reduzir a germinação de sementes de diversas plantas vasculares, incluindo Gimnospermas (*Pinus sylvestris*) e Angiospermas, árvores, arbustos e gramíneas (Pyatt, 1967; Brown & Mikola, 1974; Cowles, 1982; Lawrey, 1984; Hobbs, 1985; Sedia & Ehrenfeld, 2003).

A penetração da raiz dentro de uma crosta biológica, predominantemente composta de *Diploschistes muscorum* é significativamente menor que o observado em um solo nu, com uma consequente redução do estabelecimento de plântulas (Deines *et al.*, 2007). Assim, na maioria dos casos, plantas vasculares estão ausentes da vizinhança do líquen, sugerindo algumas estratégias de adaptação dos organismos simbióticos de crescimento lento, contra a sua maior biomassa que produzem competidores (Pyatt, 1967; Hobbs, 1985; Sedia & Ehrenfeld, 2005; Lawrey, 2009).

A geral natureza antibiótica dos compostos liquênicos sugere que eles podem funcionar como inibidores agressivos de competidores potenciais no habitat. Uma vez que os líquens geralmente possuem crescimento mais lento do que seus competidores, agentes alelopáticos proporcionam uma vantagem competitiva em ambientes onde a competição é mais intensa. Inibição de fungos micorrízicos também tem sido documentada experimentalmente (Goldner *et al.*, 1986; Lawrey, 1993; 1995; Silva, 2007) afetando indiretamente os competidores vegetais. Líquens epífitos também podem ser distribuídos de forma não aleatória como resultado da química desses organismos. Assim, o efeito fitotóxico de certos metabólitos liquênicos pode desempenhar um papel importante no estabelecimento de populações de líquens.

O potencial dos metabólitos liquênicos (Tab. 1) em interações alelopáticas pode ser observado pelos depsídeos, ácidos barbático e lecanórico e o tridepsídeo, ácido girofórico, que foram mostrados inibindo o transporte de elétrons fotossintéticos nos cloroplastos isolados (Ellis *et al.*, 1995; Endo *et al.*, 1994).

Tabela 1. Potencialidades pesticidas de metabólitos liquênicos.

COMPOSTO	CLASSE QUÍMICA	POTENCIALIDADES
(-)-16 α -hydroxykaurane	Diterpeno	Citotóxico
(+) e (-) ácido isoúsnicico	Ácido úsnico	Antimicrobiana Fungicida
(+) e (-) Ácido úsnico	Ácido úsnico	Antimicrobiano Fungicida Herbicida
Atranorina	<i>para</i> -depsídeo	Fungitóxico
Ácido Barbático	<i>para</i> -depsídeo	Inibidor do PSII
Ácido Didímico	Dibenzofurano	Antimicrobiano
Entotheino	Dibenzopiranono	Bactericida
Fallacinal	Antraquinona	Antimicrobiana
Ácido Girofórico	<i>para</i> -depsídeo	Inibidor do PSII
Ácido Haemathamnolico	<i>meta</i> -depsídeo	Inibidor do PSII
Ácido Hiascico	<i>para</i> -depsídeo	Fungitóxico
Ácido Leprapínico	Ácido Pulvínico	Antibacteriano
Ácido Lecanórico	<i>para</i> -depside	Fungitóxico Inibidor do PSII
Ácido Pinastrico	Ácido pulvínico	Antiherbivoria
Ácido Thiophanico	Xantonas	Fungicida
Ácido Thiophanínico	Xantonas	Fungicida
Ácido Ursolico	Triterpeno	Citotóxico
Ácido Vulpínico	Ácido Pulvínico	Antiherbivoria
Zeorina	Triterpeno	Antimicobacteriano

Fonte: Dayan e Romagni (2001).

Outro aspecto do potencial alelopático de líquens está relacionado com a capacidade do ácido (-)-úsico, um dos dois enantiômeros conhecidos na natureza, para inibir a biossíntese de clorofila e carotenóides através da enzima 4-hidroxifenil piruvato dioxigenase, que provocou a morte de mudas de *Lactuca sativa*, enquanto o ácido (+)-úsico não causa qualquer mudança significativa no teor de clorofila (Romagni *et al.*, 2000). Perda de clorofilas em resposta às fitotoxinas pode ser associada com a desestabilização de luz dependente de membranas celulares e subcelulares (Romagni *et al.*, 2004). Estudos limitados têm documentado os efeitos fitotóxicos do (+) e (-) ácido úsico, incluindo inibição da transpiração e processos de evolução de oxigênio nas plântulas de milho e girassol (Lasceve & Gaugain, 1990) e inibindo a urease e atividade de arginase (Proska *et al.*, 1996). Adição de ácido úsico reduz também o acúmulo de potássio, nitrogênio, fósforo e cálcio nos órgãos de plantas cultivadas, que, segundo Lechowski *et al.* (2006), a limitação da captação, transporte e acumulação desses elementos podem ser causadas por mudanças na permeabilidade das membranas (Vainshtein, 1985; Backor *et al.*, 1997), a falta de um *pool* de energia disponível indispensável para o transporte devido ao rompimento do processo de fosforilação (Vavasseur *et al.*, 1991; Abo-Khatwa *et al.*, 1996.) e quelante do ionófora ou propriedades do ácido úsico com relação a alguns cátions (Woodruff & Miller, 1963; Inoue *et al.*, 1987). O ácido úsico exibe ainda um efeito tóxico multidirecional nas vias fotossintéticas e respiratórias, e também sobre a transpiração e regulação fitohormonal do crescimento da planta (Vavasseur *et al.*, 1991; Legaz *et al.*, 2004; Latkowska *et al.*, 2006). Dessa forma, a atividade *in vitro* do ácido úsico é superior à de outros inibidores sintéticos como herbicidas de sítios alvo.

Metabólitos liquênicos, como os ácidos lecanórico, girofórico e úsico, inibem o transporte de elétrons fotossintéticos (Rojas *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 1987). Foi sugerido que estes compostos podem atuar como agentes alelopáticos, proporcionando uma vantagem competitiva produzida pelos líquens. Agem semelhantemente aos herbicidas comerciais como triazinas que agem no fotossistema II (Draber *et al.*, 1991; Duke & Dayan, 2006).

Uma série de emodina liquênica análogas ao ácido úsico causou o branqueamento de gramíneas. A continuação da investigação sugeriu uma diminuição na atividade do fotossistema II (PSII), mas o modo de ação desses compostos ainda não

foi determinado. Outro grupo de antraquinona análogo foi encontrado para inibir a germinação e a formação de raiz primária (Romagni *et al.*, 2004). Os dados preliminares sugerem que cada composto secundário de líquen possui vários papéis ecológicos. Muitos inibem vias cruciais para o desenvolvimento de plântulas. Isso pode diminuir a competição interespecífica, principalmente no dossel. Devido à sua natureza química simples e de fácil síntese, esses compostos são candidatos ideais para a produção de novos herbicidas (Dayan & Romagni, 2001).

Segundo Teixeira *et al.* (2008a), os nostoclídeos são metabólitos secundários que vêm sendo utilizados como compostos-modelos na busca por novos herbicidas. Esses metabólitos foram isolados a partir de uma alga verde-azul, da cianobacéria *Nostoc sp.*, que é encontrada em um líquen denominado *Peltigera canina*.

2.2.3 Uso de Líquens em Estudos de Alelopatia no Brasil

Um amplo espectro de estudos do potencial alelopático dos líquens é apresentado mundialmente com ênfase na Europa. No Brasil, poucos trabalhos sobre esse tema têm sido desenvolvidos. Um dos primeiros trabalhos foi o de Oliveira (1991), que estudou a ação alelopática de extratos brutos de *Cladonia dendroides* sobre a germinação de *Lactuca sativa* e observou que todos os extratos testados reduziram o percentual de germinação, mas por outro lado estimularam o desenvolvimento das radículas das plântulas germinadas. Este autor também estudou a influência da adição exógena de ureia no metabolismo de *C. dendroides* e seu potencial alelopático sobre *L. sativa* e evidenciou que as concentrações de 1,0 e 0,1 mg.mL⁻¹ de uréia sobre talos de *C. dendroides* comprometiam seu desenvolvimento radicular, ocasionando necroses e reduções de pelos absorventes. Tigre (2009) obteve resultados contrários a esses ao realizar estudos semelhantes com *Cladonia verticillaris*, onde evidenciou que o crescimento hipocotilar era induzido pelos talos, principalmente quando tratados com ureia a 1,0 mg.mL⁻¹ e o radicular somente nesta concentração, resultado este obtido por Oliveira (1991) somente em baixas concentrações de ureia (0,01 e 0,001 mg.mL⁻¹). Esses resultados demonstram que cada espécie responde de maneira diferente ao suprimento exógeno de ureia, levando a potenciais alelopáticos também diferentes, confirmando a característica espécie-específica deste fenômeno.

Yano-Melo *et al.* (1999) estudaram a atividade biológica de *C. verticillaris* e *C. substellata* sobre a germinação e desenvolvimento de *Allium cepa* e observaram que as substâncias liquênicas estimulavam o desenvolvimento da planta receptora e que essa ação estimuladora de *C. verticillaris* dependia da concentração dos extratos. Yano-Melo *et al.* (1999) também evidenciaram indução dos comprimentos médios da radícula de *A. cepa* quando submetidas ao ácido fumarprotocetrárico, o que foi corroborado anos mais tarde por Tigre (2009) em *L. sativa*.

A influência de *Cladonia salzmanii* sobre fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e no desenvolvimento de *Genipa americana* L. foi detectada por Silva (2007), que constatou que os líquens podem afetar as propriedades do solo e, conseqüentemente, desempenhar alguma influência ecológica sobre seu habitat. Foi observado que o número de esporos e a colonização micorrízica foram maiores na presença de *C. salzmanii* e, que os talos deste líquen influenciavam no desenvolvimento de plântulas de *G. americana*, especialmente quando inoculadas com FMA. Esta influência pode estar relacionada à produção e liberação do ácido barbático no solo, ou por meio de alterações químicas que este composto realizou no solo.

Os dados preliminares com nostoclídeos parecem se relacionar como uma maior eficácia a uma solubilidade em água, facilitando o acesso dos inibidores para o sítio ativo e/ou sua partição entre a água e as membranas lipofílicas do tilacóide (Teixeira *et al.*, 2008b). O seu potencial como inibidores da transferência de elétrons foi investigado. Vários deles foram capazes de interferir em vários graus com a redução de luz por ferricianeto nos cloroplastos isolados. Vinte e um dos trinta e quatro compostos testados foram de fato capazes de reduzir significativamente a taxa da cadeia transportadora de elétrons.

Tigre *et al.* (2012) observaram que os extratos etéreos, clorofórmicos e acetônicos de *C. verticillaris* causavam atraso e estímulo significativos no índice de velocidade de germinação e no tempo médio de germinação de *L. sativa*, que variaram em função da concentração. O crescimento radicular, hipocotilar e a área foliar foram induzidos ou inibidos, variando seu efeito e intensidade de acordo com o extrato e/ou concentração. Esses extratos induziram a formação de plântulas anormais e muitas alterações morfológicas como precocidade do surgimento de raízes laterais,

espessamento de raiz primária, diminuição da produção de pelos radiculares, radículas finas, necroses radiculares e cloroses.

Contudo, informações sobre os efeitos dos extratos liquênicos nas células vegetais são ainda insuficientes para o grande número de espécies e substâncias de líquens. Testes de citogenética vegetal têm corroborado para o entendimento dos mecanismos de ação dos compostos presentes nesses extratos, possibilitando a observação dos efeitos ao nível do cromossomo (clastogênese) através de alterações da estrutura e número dos cromossomos (aneuploidia e poliploidia).

Campos (2004) avaliou o efeito da sazonalidade na produção das substâncias liquênicas e seu efeito alelopático, e observou que os extratos aquosos de *Myelochroa lindmanii* e *Canoparmelia texana* inibiam o crescimento radicular de *L. sativa* e *Zea mays*, mas não afetavam a porcentagem de germinação. O efeito dos extratos parecia estar diretamente relacionado à interferência no processo de divisão celular, incluindo seu bloqueio e a indução de c-metáfase. O extrato de *M. lindmanii* parece atuar como antimitótico, afetando a dinâmica de microtúbulos que realizam as funções celulares importantes, tais como a migração de cromossomos, a estrutura celular e formação da parede celular durante o crescimento e o ciclo (Campos *et al.*, 2008). O extrato de *C. texana* reduziu os índices mitóticos e índices metafásicos, principalmente para os extratos produzidos a partir de material coletado na estação chuvosa. Um dos mais recentes trabalhos foi desenvolvido por Peres *et al.* (2009) sobre o potencial alelopático de derivados do ácido orselínico. Os diferentes efeitos do ácido lecanórico e seus derivados orselinato sobre a germinação e crescimento de *Lactuca sativa* (pouco afetada) e *Allium cepa* (fortemente afetada) destacaram que a ação alelopática de certos metabólitos pode variar em grande medida, entre diferentes espécies vegetais. Em ambas as espécies testadas observou-se significativa inibição pelo ácido lecanórico em altas concentrações e estímulo causado por alguns derivados em baixas concentrações.

O grupo de pesquisa intitulado “Líquens: estudo de substâncias bioativas e monitoramento ambiental” da Universidade Federal de Pernambuco tem estudado em suas pesquisas a influência da radiação gama como um dos fatores abióticos na produção dos aleloquímicos de *Cladonia verticillaris* e seu potencial alelopático sobre a germinação e crescimento inicial de *L. sativa*. Os resultados têm revelado que os

extratos irradiados aumentam o vigor das plântulas em 31%, estimulam o crescimento radicular em 114% e o hipocotilar em até 190%. Quase todos os tratamentos induziram a alterações morfológicas com formação de pelos radiculares e a formação de raízes laterais, principalmente quando submetidos aos extratos irradiados a 100 Gy que levaram a formação de até três raízes laterais e a formação de plântulas anormais com hipocótilo encurvado e curto (Tigre *et al.*, 2011). Esses resultados revelam que a radiação gama pode acelerar uma resposta fisiológica em *C. verticillaris*, como uma forma de defesa da radiação, induzindo uma maior produção de compostos fotoprotetores.

Estudos preliminares sobre o efeito alelopático de *Cladonia salzmanii* e *Cladonia substellata* também têm demonstrado resultados fitorreguladores sobre *L. Sativa*, aumentando o hipocótilo em até 229,17%, principalmente quando tratados com *C. salzmanii* a 0,01 mg.mL⁻¹, tendo o estímulo variado em função da concentração, ou seja, quanto mais baixa a concentração, maior o estímulo; e o comprimento radicular alongado em até 71,59% (Rodrigues *et al.*, 2011).

A estrutura química, por exemplo, o número e o comprimento de grupos alquila ligados aos anéis de benzeno e oxigênio fenólico, é importante em termos de atividade (Peres *et al.*, 2009). Essas informações poderão continuar a apoiar a recente sugestão de usar compostos liquênicos, que são quimicamente simples e possivelmente facilmente sintetizados em laboratório, como herbicidas (Dayan & Romagni, 2001; Duke *et al.*, 2002). No entanto, os diferentes efeitos, que vão da inibição à estimulação, observados em diferentes plantas testadas também deverão ser levados em conta.

Nota-se, portanto, a grande importância da realização de pesquisas nesse campo, para se conhecer os mecanismos de ação, produção e decomposição de compostos alelopáticos, assim como o ciclo desses compostos nesses organismos. Vale acrescentar que dos milhares de compostos naturais identificados a cada ano, que ocorrem nas plantas, nos micro-organismos e no solo, poucos têm sido estudados para seu uso potencial. Por isso, a complexidade bioquímica e de comportamento fisiológico entre espécies ainda é pouco compreendida.

2.3 Aplicações da Alelopatia como Modelos Agroquímicos

No Brasil, 51% dos gastos para controle de pragas, doenças e plantas daninhas, referem-se a herbicidas, o que representa em torno de 7% do consumo mundial. Sendo a classe de agroquímicos mais consumidos no país, refletindo uma tendência mundial (Velasco & Capanema, 2006).

O grande paradigma da agricultura moderna está no aumento da produção nas áreas já existentes para alimentar uma população mundial em constante crescimento. Dessa forma, a investigação sobre as estratégias de manejo de vegetação capaz de minimizar os custos de produção e, simultaneamente, favorecer a produção agrícola sustentável que seja economicamente viável precisa de atenção (Akobundu, 2000). Alelopatia se encaixa nesta abordagem como um dos princípios de integralidade de qualquer desses sistemas de cultivo de rotação de culturas envolvendo inter-culturas, cobertura vegetal, e manejo da terra em repouso (como o aumento de adubos verdes e plantio *in situ*).

Os aleloquímicos são considerados menos tóxicos do que os agroquímicos convencionais e geralmente afetam apenas os organismos relacionados ao alvo, em contraste com o amplo espectro de produtos convencionais, que podem afetar outras formas de vida. Muitas vezes os produtos a base de aleloquímicos são eficazes em pequenas quantidades e se decompõem rapidamente, resultando em uma menor exposição e com menores danos ambientais (Kokalis-Burelle & Rodríguez-Kábana, 2006). Muitos compostos naturais apresentam o mecanismo de ação bastante similar ao dos herbicidas sintéticos, tendo potencial para serem explorados como bioherbicidas ou serem conduzidos para a descoberta de novos agroquímicos (Duke, 1986; Hoagland, 2001; Mano, 2006). Dessa forma, os diferentes papéis que a alelopatia apresenta podem ser utilizados como biorreguladores na agricultura, sendo uma ferramenta emergente para uma gestão mais sustentável dos recursos naturais.

A busca pela aplicação do conhecimento da alelopatia é crucial para entender outras interações bióticas, e também o significado real dos mecanismos de ação dos metabólitos secundários no meio ambiente (Anaya, 1999). A alelopatia pode ser vista como um fenômeno ecológico (Romeo, 2000) capaz de regular a saúde do ecossistema

e da biodiversidade (Wardle *et al.*, 1997; Mallik, 2000). Contudo, as fronteiras na pesquisa em alelopatia incluem o isolamento de compostos adicionais que podem estar envolvidos, determinação mais precisa de como a produção de aleloquímicos é regulada e como agem os compostos para inibir o crescimento.

Segundo Dayan & Duke (2006) os metabólitos secundários podem ser utilizados para fins completamente diferentes das suas funções naturais, como acontece com muitos produtos naturais farmacêuticos. O interesse renovado em compostos bioativos de origem natural pode, em parte, ser atribuído a recentes avanços tecnológicos que favorecem o isolamento, a caracterização e testes de produtos naturais. Algumas das vantagens de estudar o modo de ação dos produtos naturais é que estas fitotoxinas tendem a inibir alguns sítios que são diferentes daqueles afetados por herbicidas sintéticos (Duke *et al.*, 1996, 1997, 2000). Portanto, estudar os mecanismos de ação dos produtos naturais aumenta a probabilidade de descoberta de outros novos.

Embora muitos dos aleloquímicos causem diversas alterações morfo-fisiológicas sobre as plantas receptoras e tais respostas sejam dependentes da dose de forma linear, suas concentrações necessárias para o controle de plantas daninhas em uma escala de campo é impraticável. Além disso, o grau de seletividade é muitas vezes um fator limitante para sua ampla utilização comercial e, a interface do solo em condições de campo agrícola também afeta a eficácia destes aleloquímicos (Kathiresan *et al.*, 2006). No entanto, estes metabólitos podem ser usados diretamente como herbicidas ou ainda como modelos (*lead structures*) para o desenvolvimento de novas classes de herbicidas (Godfrey, 1995; Copping, 1996; Duke *et al.*, 2000, 2002). Este tipo de estratégia pode ser considerado atrativo por várias razões. Muitos produtos naturais biologicamente ativos são parcialmente solúveis na água e, como consequência do processo de seleção natural, podem apresentar bioatividade em concentrações muito baixas. Além disso, o mecanismo de ação desses metabólitos sobre plantas daninhas é, muitas vezes, diferente daquele dos herbicidas sintéticos. Estudos têm demonstrado que os sítios moleculares de atuação de herbicidas naturais diferem significativamente dos conhecidos sítios moleculares de atuação dos herbicidas sintéticos (Duke *et al.*, 2000, 2005). A investigação desses novos mecanismos de ação de herbicidas naturais sobre as plantas daninhas é importante porque poderia resultar no planejamento racional de novas

classes de herbicidas. Ademais, herbicidas com novos sítios de ação são desejáveis para combater o rápido crescimento de plantas daninhas a eles.

Exemplos de herbicidas que são comercializados hoje em dia e que foram desenvolvidos a partir da estrutura de metabólitos secundários (Tab. 2) incluem o bialafos, a fosfonotricina, a cinmetilina, a sulcotriona e a mesotriona (Teixeira, 2008). A síntese desses compostos é realizada tendo-se como objetivo inserí-los em um amplo programa de busca de novas substâncias com potencial atividade fitotóxica, que sejam seletivas, causem menor impacto ao meio ambiente e, apresentem potencial desenvolvimento comercial.

Tabela 2. Herbicidas desenvolvidos a partir de aleloquímicos naturais

Produtos Naturais	Fontes: plantas ou micro-organismos	Herbicida	Fabricante
Anisomicina	<i>Streptomyces sp.</i>	Methoxyphenone	Nihon/Japão
Cineole	Várias plantas	Cinmethylin	Shell/USA
Benzoxazinonas (ácido Hidroxâmico)	Plantas gramíneas	Benzazin	BASF/Alemanha
Iprexil	<i>Iprex pachyon</i>	Benzadox	GULF/USA
Ácido Fusárico	<i>Fusarium sp.</i>	Picloran	Dow/USA
Ácido Quinolínico	<i>Nicotina tabacum</i>	Quincloral	BASF/Alemanha
Moniliformina	<i>F. moniliforme</i>	3,4, dibytoxymoniliformin	CIBA/Geigy./Suíça
Fosfinotricina	<i>S. viridochromegenes</i>	Glufosinate	Hoechst/Alemanha

Fonte: Hatzios (1987)

Referencial Teórico

Parte II

2.4 Mecanismos de ação dos Herbicidas

O Conhecimento do mecanismo de ação dos herbicidas é fundamental na avaliação de sua eficácia na agricultura e na compreensão do seu impacto ambiental (Oliveira Junior, 2001).

2.4.1 Inibidores do Fotossistema II (PSII)

Os pigmentos, as proteínas e outras substâncias químicas envolvidas na reação da fotossíntese estão localizados nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos. Em condições normais, sem a interferência de inibidores fotossintéticos, durante a fase fotoquímica da fotossíntese, a energia luminosa capturada pelos pigmentos (clorofila e carotenóides) é transferida para um “centro de reação” especial (P680), gerando um elétron “excitado” (Ferreira *et al.*, 2005). Este elétron é transferido para uma molécula de plastoquinona (PQ) presa a uma proteína de membrana (QA) do tilacóide. A molécula da PQ “QA” transfere o elétron, por sua vez, para outra molécula de PQ, chamada “QB” (Fig. 2), também presa na proteína. Quando um segundo elétron é transferido para a PQ “QB”, a quinona reduzida torna-se protonada (dois íons de hidrogênio são adicionados), formando uma plastohidroquinona (QbH₂), com baixa afinidade para se prender na proteína. De maneira simplificada, a função da QbH₂ é transferir elétrons entre os PSII (P680) e PS I (P700) (Ferreira *et al.*, 2005).

Os inibidores do PSII são também conhecidos como inibidores da síntese de Hill, por inibirem a evolução do oxigênio a partir da água na presença de cloroplastos e de um acceptor adequado de elétrons (Oliveira Junior, 2001). A maioria desses inibidores compete pelo sítio de ligação da PQ na proteína D1 do PSII (Draber *et al.* 1991). PQ recebe dois elétrons da proteína D1 e dois prótons (H⁺) do estroma. A forma reduzida da QbH₂ move-se através da membrana do tilacóide e doa dois elétrons para o complexo citocromo b6f, que finalmente transfere os elétrons para o fotossistema I (PSI), e liberta 2 H⁺ para dentro do lúmen. Este processo é essencial para todas as plantas e a inibição desta via de transferência de elétrons é letal (Duke & Dayan, 2006).

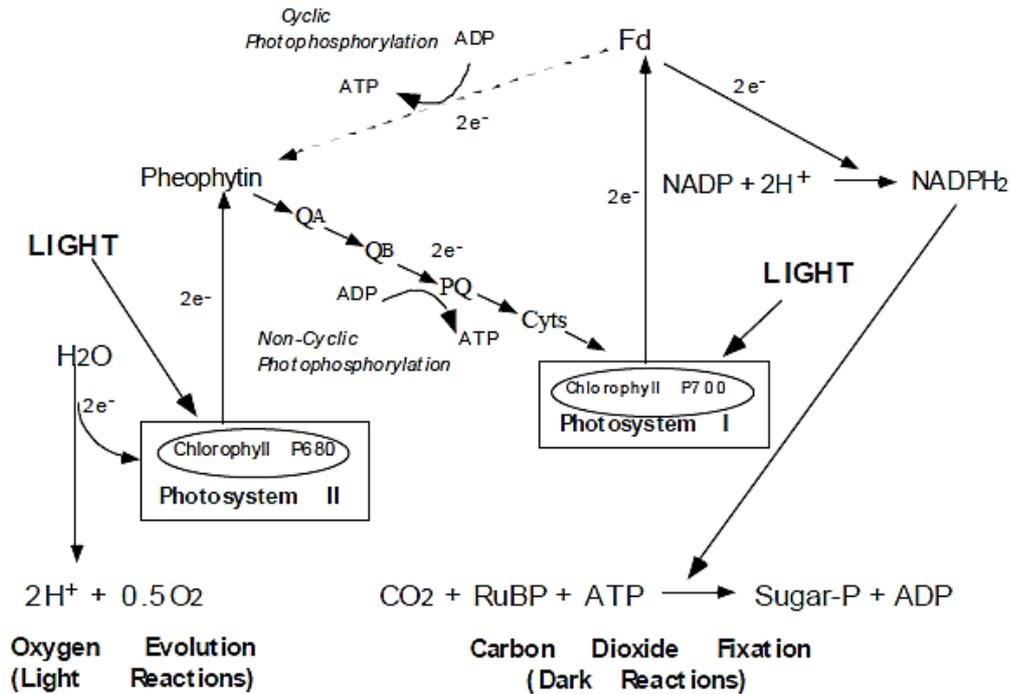


Figura 2. Esquema simplificado do processo fotossintético. (Fonte: Manual de instruções. Qubit System (Canadá).

Um grande número de herbicidas comerciais, incluindo as triazinas e ureias substituídas, compete no PSII pelo sítio de ligação da proteína D1 sobre a PQ (Draber *et al.*, 1991). Inibidores do PSII da p-quinona são análogos estruturais da PQ que concorrem pelo mesmo local de ligação no PSII (Draber *et al.*, 1995), o sítio de ligação da QB. Quinonas também imitam a função de aceitar elétrons de PQ. Após a ligação no sítio de ligação da QB, os inibidores interrompem o fluxo normal de elétrons entre os fotossistemas por dificultar a ligação de PQ. Embora a interrupção da transferência de elétrons seja por si só letal após um período de tempo, as plantas expostas a inibidores do PSII morrem de forma relativamente rápida, principalmente por causa do estresse oxidativo associado com a energização das moléculas de clorofila (Duke & Dayan, 2006). Quanto maior o fluxo de fótons, mais aguda torna-se esta tensão. Pensa-se que a clorose foliar que se desenvolve após o tratamento com os inibidores seja causada pela peroxidação lipídica. Lipídios e proteínas são oxidados, resultando em rompimento de membranas, o que faz com que células e organelas desidratem e desintegram-se rapidamente. O processo de peroxidação acontece

basicamente pela interrupção do fluxo de elétrons do PSII, o que gera um estado energético elevado da clorofila, que sobrecarrega o efeito de atenuação de energia promovido pelos pigmentos carotenoides. O excesso de clorofila em triplete pode iniciar o processo de peroxidação de lipídios por meio de dois mecanismos (Dan Hess, 1994): o primeiro é a formação direta de radicais lipídicos nos ácidos graxos insaturados constituintes das membranas. O segundo é que a clorofila em triplete pode reagir com o oxigênio para produzir oxigênio em singlete. O oxigênio pode então reagir com estes radicais ou com os ácidos graxos para iniciar o processo de peroxidação que resulta no dano às membranas (Oliveira Junior, 2001).

Muitas quinonas de diferentes plantas inibem o PSII. Sorgoleone, o aleloquímico produzido pelas raízes de *Sorghum* spp. é um inibidor particularmente potente (Einhellig *et al.*, 1993; Nimbale *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.*, 1997). Todo o sorgoleone e lipídio resorcinolítico (por exemplo, 1,3-di-hidroxi-4,6-dimetoxi-5-alkil resorcinol), congêneres produzidos por *Sorghum* spp., parecem ter como alvo o PSII, sugerindo que todos eles contribuem para o potencial alelopático dos exsudatos (Rimando *et al.*, 1998, Rimando *et al.*, 2003, Kagan *et al.*, 2003).

Os metabólitos liquênicos, ácidos lecanóricos, girofórico e úsnico inibem a cadeia transportadora de elétrons. Há relatos de que estes compostos podem atuar como agentes alelopáticos, proporcionando uma vantagem competitiva para os líquens que os produzem (Rojas *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 1987).

Inibidores do PSII têm sido, e continuarão a ser, importantes ferramentas para controle de plantas daninhas na agricultura. No entanto, o surgimento de plantas resistentes a esses inibidores comerciais é motivo de preocupação. Contudo é possível desenvolver novas classes de herbicidas que tenham este sítio alvo, baseados no esqueleto quinona que podem ajudar a resolver o problema de resistência, uma vez que as quinonas não interagem com o mesmo aminoácido no domínio da ligação da PQ. O grande problema é que a maioria dos inibidores naturais do PSII já estudados possui uma alta lipofilicidade o que não é muito adequado para o desenvolvimento de herbicidas que devem ser translocados.

2.4.2 Indutores de Estresse Oxidativo

Para garantir o monitoramento constante das condições ambientais e uma resposta rápida e adequada, as plantas desenvolveram uma percepção elaborada e robusta, bem como mecanismos de transdução de sinal (Jaspers & Kangasjärvi, 2010). Essencialmente, todos os estresses levam à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), embora em diferentes formas e em diferentes compartimentos celulares (Jaspers & Kangasjärvi, 2010). As EROs ocorrem naturalmente nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos de organismos aeróbios, como resultado dos processos de respiração e fotossíntese (Scandalios, 2005; Halliwell, 2006). Células fotossintéticas são propensas ao estresse oxidativo, pois elas contêm uma série de pigmentos fotossensibilizantes que liberam e consomem oxigênio. O sistema fotossintético de transporte de elétrons é a principal fonte de espécies de oxigênio ativas em tecidos vegetais (Asada, 1997), tem potencial para gerar ($^1\text{O}_2$) oxigênio singleto e superóxido (O_2^-). Dentre os processos exclusivos de plantas que envolvem EROs estão a lignificação das paredes celulares, importante no crescimento normal, bem como a patogênese e a senescência, esta última essencial para a maturação dos frutos e a produção de sementes (Baker & Orlandi, 2009).

Em contraste com o seu presumido papel como agentes simplesmente prejudiciais nas células, EROs atuam como moléculas sinalizadoras na regulação do desenvolvimento e na adaptação ao estresse (Møller *et al.*, 2007; Jaspers & Kangasjärvi, 2010).

Na fosforilação oxidativa, via metabólica responsável pela manutenção do equilíbrio energético dos seres aeróbios, os elétrons do NADH e do FADH_2 são transferidos ao longo da cadeia transportadora de elétrons até o receptor final, o oxigênio, sendo este reduzido a H_2O . Durante a redução do O_2 a H_2O , pode ocorrer a transferência de um, dois ou três elétrons para o O_2 , formando-se espécies mais reativas, como o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxilo (OH^\cdot), respectivamente, (Fig. 3) (Gratão *et al.*, 2005; Scandalios, 2005; Halliwell, 2006).

Normalmente, EROs são decompostas ou seus produtos de peroxidação são neutralizados pelos sistemas de defesa naturais que consistem em enzimas

especializadas, como catalase, peroxidase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, e em metabólitos de baixo peso molecular, como ascorbato e glutathione. Em condições de aumento da produção de EROs, no entanto, elas podem acumular-se, exercendo ações danosas sobre as células, incluindo peroxidação de lipídios de membrana, dano oxidativo a proteínas e DNA (Halliwell & Gutteridge, 1984) e a abertura do poro de permeabilidade mitocondrial causando, conseqüentemente, a disfunção celular e, finalmente, a morte celular, ou o aparecimento de lesões necróticas (Green & Reed, 1998; Foyer & Noctor 2005).

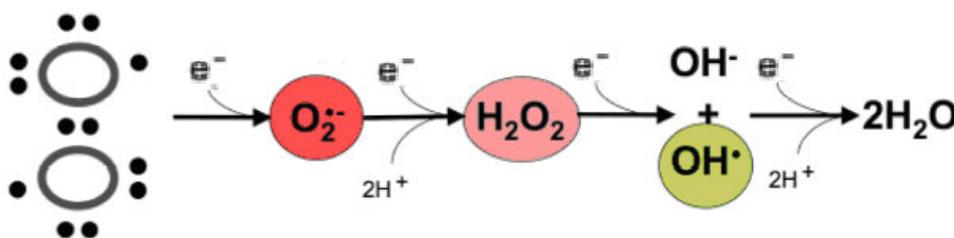


Figura 3. Distribuição de elétrons no orbital externo da molécula de oxigênio e redução deste à água com a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) por reduções parciais (adaptado de Ferreira *et al.*, 2007).

Muitos xenobióticos, tais como os herbicidas, podem produzir EROs via vários mecanismos, como interferência no transporte de elétrons na membrana mitocondrial e subsequente acumulação de intermediários reativos, inativação de antioxidantes enzimáticos, diminuição de antioxidantes não-enzimáticos e peroxidação lipídica (Modesto & Martinez, 2010). Os compostos tais como o Metil Vilogênico (também conhecido como Paraquat) induzem dano oxidativo nas plantas, como alterações nas enzimas antioxidantes. Os membros deste grupo são chamados herbicidas letais (Dodge, 1971). Outros compostos como o 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (Diuron), bloqueiam o transporte de elétrons fotossintéticos e inibem a biossíntese de carotenoides e assim iniciam processos fotooxidativos, provavelmente através da geração de $^1\text{O}_2$ (Knox, 1985; Halliwell, 1987).

Ishii-Iwamoto *et al.* (2006) relatam que α -pineno pode provocar estresse oxidativo em raízes de milho, concluindo que alguns aleloquímicos tóxicos para as

plantas ou micro-organismos podem induzir estresse oxidativo, necrose ou morte celular programada (MCP) através de suas ações sobre as mitocôndrias.

EROS estão envolvidas em mecanismos fisiológicos e bioquímicos e o estudo de suas especificidades químicas e o compartimento celular da sua liberação determinam a multiplicidade de respostas que ocorrem em plantas. Uma característica comum do acúmulo de EROs é a inibição do crescimento e da época de floração, porém ainda não foi elucidada a relação direta entre a produção de EROs e a inibição do crescimento, tornando-se uma área desafiadora para estudos futuros (Movafegh & Hoseini, 2013).

2.5. Metabolismo do nitrogênio na fisiologia dos líquens

O nitrogênio é o mais abundante elemento químico da atmosfera da Terra (aproximadamente 80%) e também é um essencial componente de muitas importantes biomoléculas. A produtividade de muitos ecossistemas é controlada por sua disponibilidade (Vitousek *et al.*, 2002). Embora essa limitação faça parte do processo natural, não é sustentável para população humana crescente que requer quantidades crescentes de nitrogênio reativo (Nr) para cultivar alimentos. Diante disso, durante as últimas décadas, o fornecimento de Nr dobrou para os ecossistemas terrestres globais como consequência da atividade humana (Galloway, 1998). Assim, por aumentarem a produtividade agrícola, os fertilizantes se tornaram ferramenta indispensável na luta mundial de combate à fome e subnutrição.

Apesar do N ser um nutriente essencial para planta, a entrada excessiva de Nr para os ecossistemas terrestres pode causar sérios riscos ecológicos (Matson *et al.*, 2002), como eutrofização dos corpos d'água, diminuição da diversidade vegetal (Gao *et al.*, 2007). (Bobbink *et al.*, 2010; Stevens *et al.*, 2010) e alteração do efeito estufa (Jiang *et al.*, 2010; Lund *et al.*, 2009).

Os líquens alimentam-se basicamente de forma higroscópica, dependendo dos nutrientes procedentes do meio para o seu metabolismo e desenvolvimento, fixando elementos do ar, notadamente o nitrogênio (Nash 1996; Seaward 1977; Guzman *et al.*, 1984). Segundo Vicente (1975) os líquens podem armazenar ureia para

utilização, quando o substrato não fornece elementos nitrogenados suficientes para as necessidades metabólicas. Porém, todos os elementos têm efeitos tóxicos quando as concentrações no talo líquênico superam os níveis tolerados (Legaz *et al.* 2006). Portanto, as práticas agrícolas, especialmente aquelas envolvendo as aplicações de fertilizantes, pode ter um efeito prejudicial em algumas espécies de líquens (Brown, 1992). Talos de *Hypogymnia physodes* transplantados pra perto de uma fábrica de fertilizantes mostraram visíveis sinais de lesão (Kauppi, 1976), e amostras de *Xanthoria parietina* expostas a crescentes concentrações de amônio mostraram perda de clorofila (Gaio-Oliveira *et al.*, 2004). A adição de N tem sido relatada como efeito negativo no crescimento e recrescimento de *Cladonia portentosa* sobre a *Calluna vulgaris* (Vagts & Kinder 1999), declínio de líquens acidofíticos em contato com fontes agrícolas de NH₃ devido o aumento do pH, tanto localmente quanto em longas distâncias onde NH₃ tinha sido transformado e depositado em solução como NH₄⁺ (Van Herk *et al.*, 2003).

O micobionte possui ureia endógena que é ativada quando o talo líquênico é imerso em água (Blanco *et al.* 1984). Estudos de Iskandar & Syers (1971) mostraram que depsídeos e depsídonas possuem baixa hidrossolubilidade. As unidades fenólicas mais solúveis em água a partir da qual esses compostos são formados (Wachtmeister 1958) podem ser esperados para ocorrer em líquens sob condições de campo (Syers & Iskandar, 1973). Segundo Henriksson (1957), amônia e outros produtos nitrogenados alcalinos derivados de ficobiontes dos líquens podem aumentar a solubilidade dos compostos líquênicos. Esses compostos são suficientemente solúveis em água para formar complexos metálicos solúveis (Syers & Iskandar, 1973). Segundo Salomon (1914), muitos líquens podem absorver amônia e nitratos de meios de cultura.

Por outro lado, um suprimento exógeno de uréia induz uma hidrólise enzimática capaz de produzir CO₂ e amônia os quais, respectivamente, aceleram a fotossíntese na alga e favorecem a síntese dos aminoácidos (Syrett 1962). A hidrólise de uréia produz dióxido de carbono que é usado para sintetizar fenóis (Blanco *et al.* 1984). Estes fenóis inibem a enzima urease mediante bloqueio de seus grupos tiol ativos (Vicente *et al.* 1978). A secreção de tais fenóis ao córtex, como uma função do tempo de incubação, poderia reverter este efeito. Cifuentes *et al.* (1981) e Vicente *et al.* (1983) relataram essa ideia demonstrando a existência de um *feedback* entre as substâncias

liquênicas e a atividade da urease, pois à medida que há o acúmulo de fenóis, a atividade da urease decresce e vice-versa. Os fenóis liquênicos bloqueiam os grupos –SH essenciais para a atividade enzimática e causam inibição impedindo a formação dos complexos enzima-substrato (Legaz *et al.* 2006). Segundo os autores, o ácido fumarprotocetrárico de *C. verticillaris* inibe a urease.

As maiores atividades da enzima estão em condições de escuro, no entanto a urease se inativa depois de certo tempo de incubação dos talos a baixas condições de iluminação. Neste caso, o grau de inativação alcançado é dependente da densidade do fluxo de radiação utilizada (Legaz & Vicente 1981; Vasconcelos *et al.*, 2013).

Dessa forma, sabe-se que nutrientes do solo, quando volatilizados, influenciam direta ou indiretamente no metabolismo liquênico, promovendo uma maior síntese de compostos bioativos, que quando percolados para o solo, influem sobre a biota microbiana modificando características do solo como pH e, disponibilidade de nutrientes (Silva 2007), podendo também causar efeitos alelopáticos sobre os organismos adjacentes.

2.6. *Cladonia verticillaris*

Espécies da família Cladoniaceae, a mais representativa deste táxon, são comumente encontradas em tabuleiros arenosos costeiros e de interior do nordeste do Brasil, com fitofisionomia de cerrado. O líquen *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., denominado cladoniforme, foi classificado em 1894 por Vanio. É considerada uma espécie endêmica da costa brasileira encontrada do Rio Grande do Sul à Paraíba (Ahti *et al.*, 1993), mas há registro para cerrados não litorâneos, visto ser extremamente influenciada pelos fatores microclimáticos locais (Legaz *et al.*, 1986), bem como regulada pelos climas sazonais, liberando quantidades diferenciadas de suas substâncias para o solo (Pereira *et al.*, 1989). Segundo Hammer (2003) a Australasia¹ é um centro de endemismo do gênero *Cladonia*, sendo a diversidade claramente notável na Nova

¹ Nome da época em que o vocábulo *Oceania* ainda não era usado e incluíam-se a Austrália, a Tasmânia e a Nova Zelândia como partes austrais da Ásia.

Zelândia, que possuía cerca de 60 espécies reconhecidas até 2003, ano em que oito novas espécies foram descobertas e mais oito estão em discussão.

Pertencente à divisão dos Discomycetes, classe dos Ascomycetes, ordem Lecanorales e família Cladoniaceae (Ahti, 1993), *Cladonia verticillaris* caracteriza-se por possuir verticilos ao longo de seu talo. Espécie de hábito terrícola possui talo esquamuloso no princípio de sua formação, tomando aspecto fruticoso, a partir do qual porções semelhantes a hastes suportam o ascostroma, também denominadas de podécios, que é parte dominante do talo (Nash, 1996). Segundo Ahti & Marcelli (1995) essa espécie é uma das mais espetaculares espécies do gênero *Cladonia* e dos líquens em geral, devido a sua variabilidade taxonômica, formando o complexo *C. verticillaris*.

Quando submetida a pouca umidade apresenta cor branco-acinzentada e aspecto amarronzado; quando exposta diretamente à luz solar, em período chuvoso, seu talo torna-se mesclado de verde e branco. Possui talo primário evanescente, podécios pouco ramificados, com cífos sobrepostos, curtos e amplos, poros nas articulações com o cífo superior. Tem, usualmente, 7 cm a 12 cm de altura (Pereira, 1998).

C. verticillaris produz o ácido fumaprotocetrárico (FUM) como composto principal e, o ácido protocetrárico (PRO), Fig. 4, e a atranorina (ATR), Fig. 5, como substâncias acessórias (Ahti *et al.*, 1993; Pereira, 1998). Contudo, Ahti *et al.* (1993) observaram além dessas substâncias a constância do ácido confumarprotocetrárico (Cph₂).

Líquens do gênero *Cladonia*, embora não possuam uma associação com o substrato tão íntima quanto os líquens crustosos, contribuem para a formação de húmus através da desintegração de fragmentos do talo (Asta *et al.*, 2001). Estudos revelam, que componentes biologicamente ativos de extratos aquosos de 15 espécies do gênero *Cladonia* inibiram o crescimento de *Allium cepa* (Oswiecimska *et al.*, 1979).

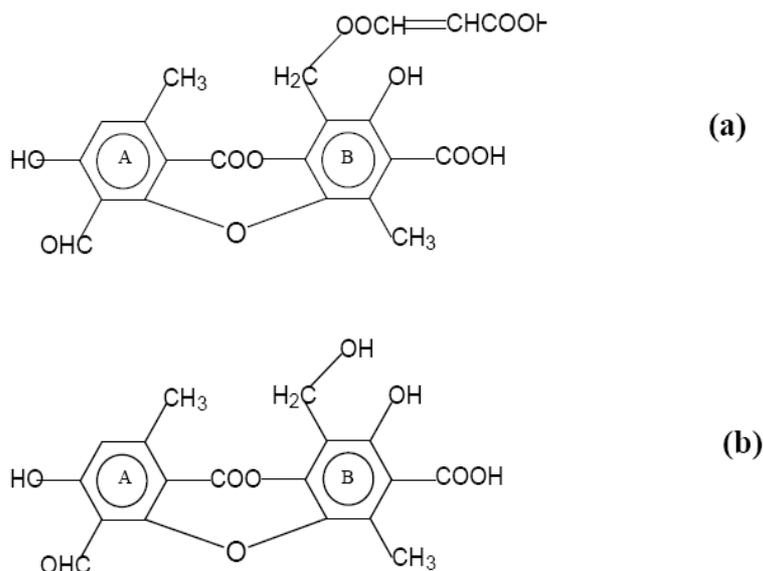


Figura 4. Modelo estrutural do ácido fumarprotocetrárico (a) e protocetrárico (b).

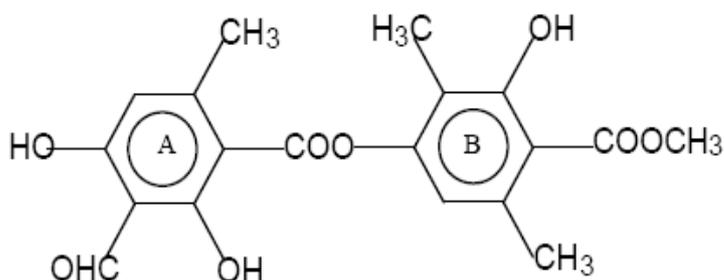


Figura 5. Modelo estrutural da atranorina

2.6.1 Ácido Fumarprotocetrárico

As unidades estruturais fenólicas podem ciclizar-se pela condensação aldol intramolecular levando a formação de compostos do tipo ácido orselínico, que formará a partir da ciclização os depsídeos, depsidonas e dibenzofuranos (Yano-Melo, 1994). Diferenças estruturais entre depsídeos e depsidonas não ocorrem necessariamente após a ciclização. Por exemplo, o FUM pode ser originado por inserção do ácido fumárico na posição 3 do ácido orselínico (na forma de ácido 3-metil-orselínico) dando origem ao anel B do FUM (Fig.6), ou por esterificação direta do grupo -CH₂OH do anel B do PRO

(Fig. 7) com o ácido fumárico (Vicente & Legaz, 1988; Honda & Vilegas, 1998). O FUM surge então de uma reação de condensação oxidativa. Dessa forma, o FUM possui estrutura similar ao PRO. Ambas as substâncias são depsídonas formadas por duas unidades aromáticas substituídas. Seus cristais são também semelhantes, em forma de pequenas agulhas, com ponto de fusão em torno de 250°C (Asahina & Shibata, 1954). Ambos os compostos são derivados do β -orcinol e biossintetizados pela via do acetato polimalonato, entretanto o FUM é derivado da ATR e em etapas subsequentes, produz-se o ácido hipoprotocetrárico (HIPO) e seu aldeído (Fig. 8). A partir deles, há a biossíntese do PRO (Pereira *et al.*, 1999). O FUM é classificado como um aldeído derivado de depsidona (Huneck, 1973) que está presente na medula do talo liquênico (Garcia-Junceda & Xavier-Filho, 1986; Huovinen *et al.*, 1990).

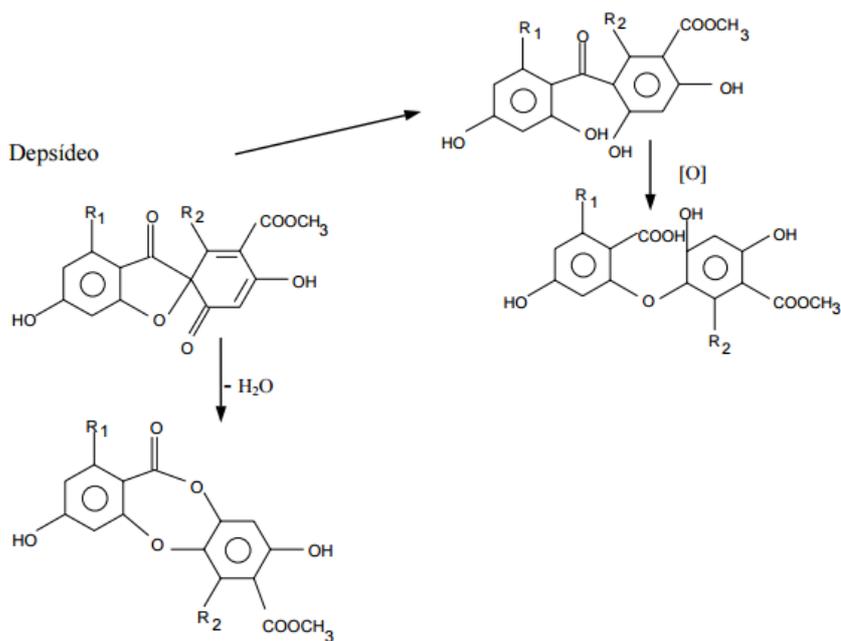


Figura 6. Reação entre 3-metil ácido orselínico e ácido fumárico para obtenção do ácido fumarprotocetrárico. Fonte: Honda, 1997.

O FUM possui uma série de bioatividades tanto ecológica, quanto econômica. Segundo Schatz (1963), Syers (1969) e Vasconcelos (2007), esse composto possui ação pedogenética, podendo reagir com partículas de granito e mica, podendo ser imprescindível à formação do solo e sucessão ecológica. Após períodos chuvosos, o

FUM pode ser lixiviado para o solo e ter função alelopática (Xavier-Filho *et al.* 1985; Silva, 2007). Possui atividade antiherbívoria (Reumatimann & Scheidegger, 1987) e contribui na regulação da atividade da urease (Vicente e Xavier-Filho, 1979). Pode ser usado no combate a resfriados, bronquites, asma, anorexia e desordens gástricas (Huovinen *et al.* 1983).

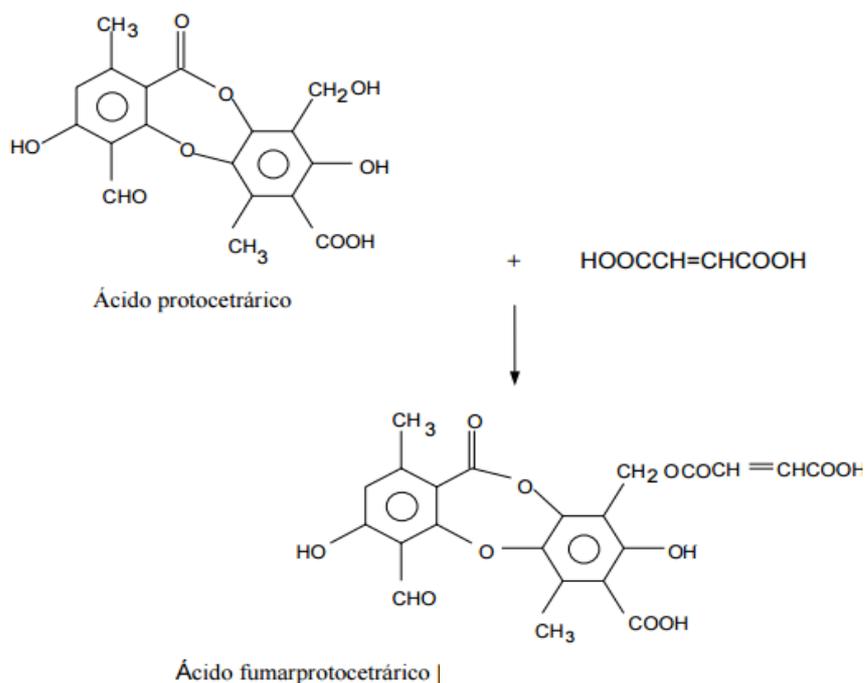


Figura 7. Reação de formação do ácido fumarprotocetrário por esterificação do grupo CH₂OH da posição 3' do ácido protocetrário com ácido fumárico. Fonte: Honda, 1997.

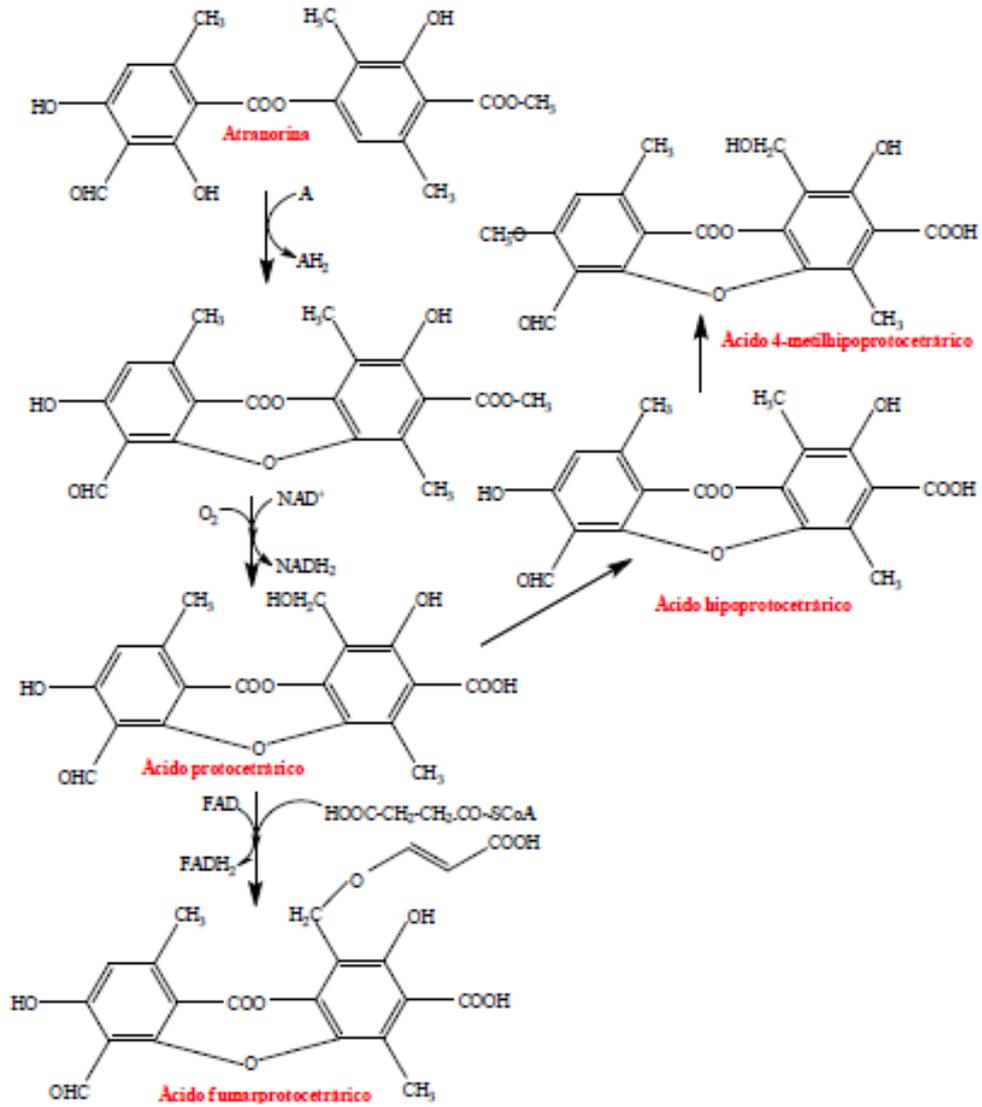


Figura 8. Rota metabólica do ácido fumarprotocetrário (Fonte: Pereira *et al.*, 1999 com modificações).

Referencial Teórico

Parte III: Procedimentos Metodológicos

2.7 Procedimentos Metodológicos

2.7.1 Extração, Identificação, Isolamento e purificação de substâncias

Um dos procedimentos mais empregados em fase inicial de prospecção de atividade alelopática dos líquens é o uso de extratos brutos. Porém, precauções durante os processos de extração são necessárias para assegurar que os aleloquímicos não sejam destruídos, ou que os artefatos químicos não sejam produzidos. Excesso de aquecimento ou a secagem das amostras podem destruir ou inativar compostos. Muitas vezes, os artefatos são produzidos também por oxidação e ação enzimática sobre substratos aleloquímicos. A escolha de um solvente também é importante e determina quais classes dos aleloquímicos serão extraídos, e o armazenamento adequado dos extratos e/ou material liquênico evita que a contaminação por microorganismos possa degradar compostos ativos (Blum, 1999; Wu *et al.*, 2001; Hoagland & Williams, 2004).

Produtos liquênicos geralmente são depositados como cristais insolúveis em água na superfície externa das hifas fúngicas (Fahselt & Hageman, 1994; Honegger, 1998), que podem ser extraídos com solventes orgânicos; em alguns casos, sem prejudicar a função metabólica dos simbiontes (Solhaug & Gauslaa, 2001). Alguns compostos são encontrados apenas nos tecidos corticais acima da camada do fotobionte, enquanto outros se limitam a tecidos internos medulares, ou em específicas estruturas vegetativas e reprodutivas específicas. Dessa forma, em estudos de exploração inicial, especialmente quando não há qualquer informação sobre a espécie e, para se obter uma avaliação mais realista das reais potencialidades do líquen como fornecedor de agentes alelopáticos, obtendo-se tanto os compostos corticais quanto os medulares, o desejável é que se utilize uma série de solventes, seguindo uma sequência crescente de grau de polaridade (eluotrópica). A extração é realizada a partir dos solventes orgânicos éter, clorofórmio, acetona, metanol, água ou tampão fosfatado que são submetidos a extrações sucessivas em extrator de soxhlet ou maceração estática. A extração é realizada por esgotamento, que consiste em deixar o material liquênico em máximo contato com os solventes até a retirada total dos compostos. Posteriormente os extratos são filtrados, rotaevaporados ou liofilizados, calculado o rendimento e preparadas as soluções em diferentes concentrações. A seleção inicial pode ser feita utilizando-se curvas de dose-resposta para a concentração dos aleloquímicos variando de 10^{-4} a 10^{-9} M (Macias *et al.*, 2006)

Os compostos normalmente são identificados por testes de *spots* em cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta performance (CLAE) e posteriormente isolados e purificados.

2.7.2 Características físico-químicas

Dentre as características químicas, a avaliação do pH dos extratos é fundamental quando se desconhece sua constituição em açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, íons e outras moléculas, pois valores extremos de pH dos extratos podem atuar sobre as plântulas e mascarar o efeito alelopático (Ferreira & Aquila, 2000). Com o auxílio de um pHmetro e de um osmômetro é medido o pH e a concentração molar de cada extrato. Soluções com polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) são preparadas na mesma osmolaridade dos extratos segundo a metodologia de Vilela *et al.* (1991), como controles negativos dos extratos, pois, notadamente os extratos brutos ou fração aleloquímica, desempenham efetivo papel aditivo no resultado geral, contribuindo para maior inibição da germinação, o que significa não só superestimar os efeitos alelopáticos, em determinados casos, como, ainda, admitir a existência de alelopatia em casos onde não exista (Wardle *et al.*, 1992; Souza Filho & Alves, 2000).

2.7.3 Bioensaios

Os bioensaios são uma parte integrante de todos os estudos de alelopatia. Eles têm usos múltiplos tais como a avaliação do potencial alelopático de diferentes organismos, detecção de atividade durante a extração, purificação e identificação de compostos bioativos. As técnicas utilizadas variam muito e é preciso padronizar o procedimento de forma independente, e modificar de acordo com a ocasião e condições (Kathiresan *et al.*, 2006). Eles são baseados na habilidade de medir um parâmetro que responde à presença do composto no ensaio. Normalmente, o parâmetro selecionado é aquele que é mais sensível ao aleloquímico.

Os experimentos são realizados em câmara de germinação com temperatura e fotoperíodo controlado de acordo com a exigência da espécie, com duração de sete a

dez dias. Os testes são realizados em placas de Petri esterilizadas contendo duas folhas de papel de filtro previamente autoclavadas, e umedecidas com 6 mL dos extratos orgânicos e da substância purificada distribuídos uniformemente. As placas são deixadas abertas em câmara de fluxo laminar durante 12 h para completa evaporação dos solventes, para depois receberem as sementes-teste e 6,0 mL de água destilada, mantendo-se dessa forma, a mesma concentração. Os extratos aquosos e tamponados são utilizados diretamente sobre o papel-filtro na placa, sem evaporação.

Quando a quantidade de aleloquímicos é limitada, culturas em ágar podem ser utilizadas. Contudo, em sua maioria, os compostos liquênicos são insolúveis em água, sendo muitas vezes necessário solubilizá-los em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1% v/v.

O controle negativo pode ser obtido com o uso de água destilada e PEG 6000 na mesma osmolaridade dos extratos e, o controle positivo pode consistir de uma solução do agente mutagênico como etil metanosulfonato (EMS) dissolvido em 1 mL de tampão de fosfato de sódio (PBS), pH 7,4 a $620 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e de uma solução aquosa (4 mg mL^{-1}) como o herbicida glifosato. Os extratos, a substância química isolada e as soluções dos controles são aplicados apenas uma vez, no início de cada bioensaio.

O número de sementes por placa varia de acordo com o tamanho das sementes, existindo uma ampla faixa de variação, que vai desde 5 até 50 sementes por placa (Souza-Filho *et al.* 2010). Em experimentos com *L. sativa*, por exemplo, utilizam-se 50 aquênios/placa por se tratar de uma semente pequena. Essa variação existe por acreditar que há uma relação entre densidade de sementes e intensidade dos efeitos alelopáticos inibitórios, onde quanto maior o número de sementes, menores são os efeitos inibitórios alelopáticos (Weidenhamer *et al.*, 1989; Souza Filho *et al.* 2003; Tseng *et al.* 2003). Acredita-se que possa haver competição entre as sementes para absorção da solução presente na placa.

A germinação de sementes é usada como teste na maioria dos bioensaios (Rice, 1984; Putnam & Tang, 1986). Embora diferentes tipos de bioensaios sejam utilizados, todos eles, em geral, incluem sementes em contato com um substrato saturado com a solução-teste. São consideradas germinadas as sementes que apresentam protusão radicular igual ou maior que 2 mm (Brasil, 2009) que é marcado por um período de tempo. Os fatores que precisam ser mantidos constantes são a

disponibilidade de oxigênio da solução-teste, pH e temperatura. O alongamento do hipocótilo e coleótilo é frequentemente observado juntamente com a germinação e a biomassa seca, que é mais fácil de medir, podendo ser usada como medida de crescimento (Bhowmik & Doll, 1984). A germinação é monitorada realizando contagens diárias de germinações e ao final do experimento é calculada a porcentagem de sementes germinadas e o tempo médio de germinação.

O bioensaio de crescimento ocorre nas mesmas especificações do bioensaio de germinação, porém as sementes são germinadas previamente em água destilada e somente depois as plântulas são transferidas para as soluções, simulando dessa forma a ação de herbicidas comerciais Pré-emergentes e Pós-emergentes. Além do mais, é possível se obter uma padronização no tamanho das plântulas no bioensaio de crescimento, uma vez que são utilizadas plântulas germinadas no mesmo período de tempo. Pelo mesmo princípio de densidade e intensidade do efeito, o número de plântulas neste bioensaio (Pós-emergente) pode variar de 5 a 10 plântulas e o experimento tem duração de 10 dias.

O desenvolvimento das plântulas é avaliado através de parâmetros biométricos. Posteriormente as plântulas são classificadas em normais ou anormais e calculado o percentual de plântulas sobreviventes. As raízes primárias são observadas sob microscópio estereoscópico, para observação da existência de zona de pelos absorventes e toda alteração morfológica, como por exemplo, necroses, aparecimento de raízes laterais, cloroses e murchas.

A consideração mais importante na escolha ou desenvolvimento de um bioensaio para o estudo alelopático é a seleção das espécies-alvo de mono e dicotiledôneas, a fim de determinar o potencial da seletividade aleloquímica. O modelo mais utilizado para plantas daninhas é *Lactuca sativa* L. que tem sido amplamente utilizada como um organismo de ensaio por causa da sua rápida germinação, uniformidade e sensibilidade (Einhelling & Rasmussen, 1979), pois segundo Dayan & Duke (2006) essas características são essenciais para se obter dados sem atrasos indevidos. O problema é que ela é extremamente sensível aos efeitos tanto de extratos brutos como de aleloquímicos. Essa característica é importante quando se precisam identificar atividades sutis, porém pode induzir a erros, pois pode levar a superestimar a atividade do aleloquímico ou mesmo induzir toxicidade onde na

realidade ela não existe ou é inexpressiva. Esse problema é especialmente crucial quando se tem *L. sativa* a única espécie receptora. Assim, o uso de mais de uma espécie permite melhor dimensionamento das reais potencialidades alelopáticas das espécies doadoras (Souza-Filho *et al.*, 2010). Ao se detectar atividade alelopática em plantas-indicadoras como *L. sativa*, prepara-se bioensaio com espécies de plantas daninhas, porém esses bioensaios apresentam algumas dificuldades. Muitas destas espécies possuem baixas taxas de germinação e requerem alguma forma de estímulo, tais como escarificação (mecânica ou ácida), choque, luz tratamentos osmóticos ou de temperatura (Buhler & Hoffman, 1999), podendo levar a informação equivocada, porque a indução da germinação não necessariamente implica desenvolvimento das plantas, sobretudo em condições ambientais desfavoráveis (Souza-Filho *et al.*, 2010).

2.7.4 Interpretação dos resultados e perspectivas

Durante a realização dos bioensaios é possível observar uma sensibilidade diferencial aos aleloquímicos, sendo normalmente mais elevada em bioensaios de crescimento do que em bioensaios de germinação. Em muitos deles, o que se observa é um efeito alelopático mais pronunciado sobre o desenvolvimento inicial de uma plântula alvo quando comparado à germinação, já que este último processo utiliza reservas da própria semente. Essa dependência das reservas pode fazer com que a germinação seja menos suscetível a fatores exógenos (Miró *et al.*, 1998; Jacobi & Ferreira, 1991; Ferreira & Aquila, 2000), bem como a possibilidade de que durante o processo de embebição, muitos aleloquímicos ficam retidos pelos tegumentos protetores do embrião, não chegando até eles em concentrações significativas a ponto de interferir na sua expansão (Pina, 2008).

Em concentrações suficientemente altas, praticamente qualquer composto afetará *in vitro* uma atividade dos processos enzimáticos ou fisiológicos, tais como a respiração. Se um composto é substancialmente ativo *in vitro* apenas em concentrações milimolar, é improvável agir como uma fitotoxina na natureza. Então, devem-se utilizar compostos que têm efeitos *in vitro* em concentrações submillimolares (Duke & Dayan, 2006).

Assim, programas de descoberta de agroquímicos são dependentes em bioensaios apropriados, que devem ser padronizadas e reproduzíveis. A miniaturização dos bioensaios é altamente desejável uma vez que, por natureza, o isolamento biomonitorado de produtos naturais normalmente produz pequenas quantidades de compostos a serem testados. Esses bioensaios e testes fisiológicos projetados para usar uma pequena quantidade de compostos são a chave para as estratégias de elucidação dos mecanismos de ação. *Insight* para a ação dos responsáveis produtos químicos é fundamental para uma explicação mais completa de alelopatia e a sua aplicação para melhorar a produção agrícola. Segundo Anaya (2006), a relação entre a inibição do crescimento e do correspondente mecanismo fisiológico é indescritível. Já Ferreira & Áquila (2000), consideram os efeitos visíveis dos compostos sobre as plântulas é somente uma sinalização secundária de mudanças ocorridas anteriormente ao nível molecular e celular. Estas alterações podem ser pontuais, mas como o metabolismo consiste numa série de reações com vários controles do tipo *feedback*, rotas inteiras podem ser alteradas, mudando processos. Segundo Reigosa *et al.* (1999) cada processo fisiológico tem resposta diferente a certas doses de cada aleloquímico em particular. A grande parte do problema é a matriz e a diversidade de aleloquímicos. A maioria dos casos de inibição alelopática é resultado da ação simultânea de diversos compostos, e muitas vezes estes incluem compostos cuja composição química é divergente.

No geral, os resultados observados são tanto de estímulo, quanto de inibição de algum processo. Assim, os diferentes papéis que a alelopatia possui podem ser utilizados como biorreguladores na agricultura, sendo uma emergente ferramenta para uma gestão mais biorracional dos recursos naturais.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo-Khatwa, A.N.; Al-Robai, A.A.; Al-Jawhari, D.A. 1996. Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria. **Natural Toxins** **4**: 96–102.
- Ahmadjian, V. 1993. **The Lichen Symbiosis**. Wiley, New York, 250 p.
- Ahti, T. 1993. Cladoniaceae. *In*: W. Greuter [ed.], Names in current use in the families Trichocomaceae, Cladoniaceae, Pinaceae, and Lemnaceae. **Regnum Vegetabile** **128**: 58–106.
- Ahti, T.; Marcelli, M.P. 1995. Taxonomy of the *Cladonia verticillaris* complex in South America. **Bibliotheca Lichenologica** **58**: 5-26.
- Akobundu I.O. 2000. **Getting weed management technologies to farmers in the developing world**. Proceedings of III International Weed Science Congress, Brazil, CD-ROM. International Weed Science Society, Oxford, MS, USA. 2 p.
- Alves, P.L.C.A. 1992. **Estudo das propriedades alelopáticas de espécies de *Eucalyptus* spp. e sua potencialidade no manejo de plantas daninhas**. Relatório FINEP. Jaboticabal: FCAV.
- Almeida, A.R.P. 1990. A defesa das plantas. **Ciências Hoje** **11** (62): 38-45.
- Anaya, A. 1999. Allelopathy as a tool in the management of biotic resources in agroecosystems. **Critical Reviews in Plant Sciences** **18**: 697-739.
- Anaya A.L. 2006. Allelopathic organisms and molecules: Promising bioregulators for the Control of plant diseases, weeds, and other pests. Pp. 31-87. *In*: Inderjit, K.M.; Mukerji, K.G. (Eds.). **Allelochemicals: Biological control of plant pathogens and diseases**. Springer, Netherland.
- Asada, K. 1997. The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. Pp. 27, 273-278. *In*: Scandalios, J.G. (Ed.). **Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defense**. Monograph Series, vol. 34. Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Asahina, Y.; Shibata, S. 1954. **Chemistry of Lichen Substances**. Tokyo. Japanese Society Promotion of Science.
- Asta, J.; Orry, F.; Toutan, F.; Souchier, B.; Villemin, G. 2001. Micromorphological and ultrastructural investigations of the lichen-soil interface. **Soil Biology & Biochemistry** **33**, 323-337.
- Backor, M.; Gaburj´akova, J.; Hud´ak, J.; Ziegler, W. 1997. The biological role of secondary metabolites from lichens. I. The influence of usnic acid on biomolecular lipid membranes. **Physiologia Plantarum** **29**: 67–71.

- Backor, M. Peksa, O.S.; Kaloud, P.; Backorova, M. 2010. Photobiont diversity in lichens from metal-rich substrata based on ITS rDNA sequences. **Ecotoxicology and Environmental Safety** **73**: 603–612.
- Baker, C.J.; Orlandi, E.W. 2009. Sources and effects of reactive oxygen species in plants. **Plant and Soil** **99** (3): 59-67.
- Baziramakenga, R.; Simard, R.R.; Leroux, G. D. 1994. Effects of benzoic and cinnamic acids on growth, mineral composition and chlorophyll content of soybean. **Journal of Chemical Ecology** **20** (11): 2821-2833.
- BeGora, M.D.; Fahselt, D. 2001, Usnic acid and atranorin concentrations in lichens in relation to bands of UV irradiance. **Bryologist** **104**: 134–140.
- Bhowmik, P.C.; Doll, J.D. 1984. Allelopathic effects of annual weed residues on growth and nutrient uptake of corn and soybeans. **Agronomy Journal** **76**: 383-388.
- Białonska, D.; Dayan, F.E. 2005. Chemistry of the lichen *Hypogymnia physodes* transplanted to an industrial region. **Journal of Chemical Ecology** **31**: 2975–2991.
- Bjerke, J., Lerfall, H., Elvebakk, A. 2002. Effects of ultraviolet radiation and PAR on the content of usnic and divaricatic acids in two arctic-alpine lichens. **Photochem. Photobiol. Sci.** **1**: 678–685.
- Blanco, M.J.; Suarez, C.; Vicente, C. 1984. The use of urea by *Evernia prunastri* thalli. **Planta** **162**: 305-3 10.
- Blum, U., 1999. Designing Laboratory Plant-debris Soil Bioassays Some Reflections. pp: 17-23. *In*: Inderjit, K.M.M.; Dakshini; Foy, C.L. (Eds.). **Principles and Practices of Plant Ecology**. CRC Press, Boca Raton, FL., USA.
- Bobbink, R.; Hicks, K.; Galloway, J.; Spranger, T.; Alkemade, R.; Ashmore, M.; Bustamante, M.; Cinderby, S.; Davidson, E.; Dentener, F.; Emmett, B.; Erisman, J.W.; Fenn, M.; Gilliam, F.; Nordin, A.; Pardo, L.; De Vries, W. 2010. Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. **Ecological Applications** **20**: 30-59.
- Boyette, C.D.; Abbas, H.K. 1995. Weed control with mycoherbicides and phytotoxins. *In*: Inderjit, K.M.M.; Dakshini; Einhellig, F.A. (Eds.). **Allelopathy: Organisms, Processes and Applications**. Washington DC, USA: American Chemical Society.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília. 399p.
- Brattsten, L.B. 1986. Fate of ingested plant allelochemicals in herbivorous insects. Pp. 211. *In*: Brattsten L.B.; Ahmand, S. (Eds). **Molecular Aspects of Insect-Plant Interactions**. John Wiley and Sons, NY.

- Bremner, J.M.; McCarty, G.W. 1993. Inhibition of nitrification in soil by allelochemicals derived from plants and plant residues. *In*: Bollag, J.; Stotzky, G. (Eds.). **Soil biochemistry**. Vol. 8. New York, USA: Marcel Dekker.
- Brown, R.; Mikola, P. 1974. The influence of fruticose soil lichens upon the mycorrhizae and seedling growth of forest trees. **Acta Forestalia Fennica** **141**: 5-23.
- Brown, D.H. 1992. Impact of agriculture on bryophytes and lichens. Pp. 259–283. *In*: Bates, J.; Farmer, A. (Eds.) **Bryophytes and Lichens in a Changing Environment**. Oxford: Clarendon Press.
- Buhler, D.D.; Hoffman, M.L. 1999. **Andersen's guide to practical methods of propagating weeds and other plants**. Weed Science Society of America, Allen Press, Lawrence, KS, USA.
- Callaway, R.M.; Reinhart, K.O.; Tucker, S.C.; Pennings, S.C. 2001. Effects of epiphytic lichens on host preference of the vascular epiphyte *Tillandsia usneoides*. **Oikos** **94**: 433-441.
- Campanella, L.; Delfini, M.; Ercole, P.; Iacoangeli, A.; Risuleo, G. 2002. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. **Biochimie** **84** (4): 329-334.
- Campos, J.M.S. 2004. **Investigação citogenética do potencial alelopático de espécies de líquens e pteridófitas**. Dissertação. Universidade Federal de Lavras. 86p.
- Campos, J.M.S.; Davide, L.C.; Soares, G.L.G.; Viccini L.F. 2008. Mitodepressive and clastogenic effects of aqueous extracts of the lichens *Myelochroa lindmanii* and *Canoparmelia texana* (Lecanorales, Parmeliaceae) on meristematic cells in plant bioassays. **Genetics and Molecular Biology** **31** (1): 141-145.
- Carmo, F.M.S., Borges, E.E.L.; Takaki, M. 2007. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta botanica brasílica** **21** (3): 697-705.
- Caviglia, A.M.; Nicora, P.; Modenesi, P.; Giordani, P.; Brunialti, G.; Modenesi, P. 2001. Oxidative stress and usnic acid content in *Parmelia reticulatum* and *Parmelia sulcata* (Lichens). **Il Farmaco** **56**: 379–382.
- Chou, C.H. 1989. The role of allelopathy in phytochemical ecology. *In*: Chou, C.H.; Waller, G.R. (Eds.) **Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and Insect Pheromones and Allomonas**. Taipei, Taiwan: Institute Botanica Academia Sinica.
- Chou, C.H. 1999. Methodologies for allelopathic research: from fields to laboratory. Pp. 3-24. *In*: Macias, F.A.; Galindo, J.C.G.; Molinillo, J.M.G.; Cutler, H.G. (Eds.) **Recent advances in allelopathy**. Cadiz, Serv. Pub. Univ. Cadiz.

- Cifuentes, B., Estvezz, M.P.; Vicente, C. 1981. *In vivo* protection of urease of *Evernia prunastri* by dithiothreitol. **Physiologia Plantarum** **53**: 245-248.
- Copping, L. G. 1996. **Crop Protection Agents from Nature. Natural Products and Analogues**; Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K.
- Correia, N.M. 2002. **Palhadas de sorgo associadas ao herbicida imazamox no controle de plantas daninhas e no desenvolvimento da cultura da soja em sucessão**. 2002. 58 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Cowles, S. 1982. Preliminary results investigating the effect of lichen ground cover on the growth of black spruce. **Naturaliste Canadien** **109**: 573-581.
- Crittenden, P.D.; Porter, N. 1991. Lichen forming fungi: potential sources of novel metabolites. **Trends in Biotechnology** **9**: 409-414.
- Culberson, C.F.; Elix, J.A. 1989. Lichen substances. *In*: Dly, P.M.; Harbourne, J.A.; (Eds.). **Methods in Plant Biochemistry. Plant Phenolics**. Academic Press, London.
- Dan Hess, F. 1994. Mode of action of lipid biosynthesis inhibitors (graminicides – ACCase inhibitors). Pp. 201-216. *In*: **Herbicide Action Course**. West Lafayette: Purdue University.
- Dayan, F.E.; Duke, S.O. 2006. Clues in the search for new herbicides. Pp. 63-83. *In*: Reigosa, M., Pedrol, N., Gonzalez, L. (Eds.). **Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications**. Springer, Amsterdam.
- Dayan, F.E.; Romagni, J.G. 2001. Lichens as a potential source of pesticides. **Pesticide Outlook** **12**: 229-232.
- Danks, M.L.J.S.; Fletcher, N.D.E.L.; Rice. 1975. Influence of ferulic acid on mineral depletion and uptake of ⁸⁶Rb by Paul's Scarlet Rose cell-suspension. **American Journal of Botany** **62**: 749-755.
- Dakshini, K.M.M.; Foy, C.L.; Inderjit. 1999. Allelopathy: one component in a multifaceted approach to ecology. Pp. 3-14. *In*: Inderjit; Dakshini, K.M.M.; Foy, C.L. (Eds.). **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton, CRC Press.
- De Candolle, M.A.P. 1832. **Physiologie Vegetale**. Tome III. Paris: Bechet Jeune, Lib. Fac. Med., pp. 1474-475.
- Deines, L.; Rosentreter, R.; Eldridge, D.J.; Serpe, M.D. 2007. Germination and seedling establishment of two annual grasses on lichen-dominated biological soil crusts. **Plant and Soil**. **295**:23-35.
- Dodge, A.D. 1971. The mode of action of bipyridylum herbicides, paraquat and diquat. **Endeavour** **30**: 130-5.

- Draber, W.; Tietjen, K.; Kluth, J.F.; Trebst, A. 1991. Herbicides in photosynthesis research. **Angewandte Chem Internat** **30**: 1621-1633.
- Draber, W.; Trebst, A.; Oettmeier, W. 1995 Structure-activity relationships of quinone and acridone photosystem II inhibitors. Pp. 186-198. *In*: Hansch, C.; Fujita, T. (Eds). **Classical and Three-Dimensional QSAR in Agrochemistry**. American Chemical Society Symposium Series, Washington DC.
- Duke, S.O. 1986. Naturally occurring chemical compounds as herbicides. **Reviews of Weed Science** **2**: 15-44.
- Duke, S.O. 1996. Herbicide-resistant crops - Background and perspectives. Pp. 1-10. *In*: Duke, S.O. (Ed.). **Herbicide-Resistant Crops - Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects**. Lewis Publishers, Chelsea, MI.
- Duke, S.O. 1997. 'Will herbicide resistance ultimately benefit agriculture?' Pp. 323-331. *In*: DePrado, R.J.; Jorrín; García-Torres, L. (Eds). **Weed and Crop Resistance to Herbicides**, Kluwer Academic Publishers.
- Duke, S.O.; Dayan, F.E.; Rimando, A.M. 2000. Natural products and herbicide discovery. Pp. 105-133. *In*: AH Cobb, RC. Kirkwood (Eds). **Herbicides and their Mechanisms of Action**, Academic Press, Sheffield.
- Duke, S.O.; Dayan, F.E.; Rimando, A.M.; Schrader, K.K.; Aliotta, G.; Oliva, A; Romagni, J.G. 2002. Chemicals from nature for weed management. **Weed Science** **50**: 138-151.
- Duke, S.O. 2005. Taking stock of herbicide-resistant crops ten years after introduction. **Pest Management Science** **61** (3): 211-218.
- Duke, S.O.; Dayan, F.E. 2006. Modes of action of phytotoxins from plants. Pp. 511-536. *In*: Reigosa, M.J.; Pedrol, N.; González, L. (Eds.). **Allelopathy: A physiological process with ecological implications**. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Durigan, J.C.; Almeida, F.S. 1993. Noções sobre a alelopatia. **Boletim Técnico**. Jaboticabal: UNESP/FUNEP, 28 p.
- Einhellig, F.A.; L. Kuan. 1971. Effects of Scopoletin and Chlorogenic acid on stomatal aperture in tobacco and sunflower. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**. **98**: 155-162.
- Einhellig, F.A.; Rasmussen, J.A. 1979. Effects of tree phenolics acids on chlorophyll content and growth of soybean and grain sorghum. **Journal of Chemical Ecology** **5**: 815-24.
- Einhellig, F.A.; Rasmussen, J.A.; Hejl, A.M.; Souza, I.F. 1993. Effects of root exudates sorgoleone on photosynthesis. **Journal of Chemical Ecology** **19**: 369-375.

- Einhellig, F.A. 1996. Interactions involving allelopathy in cropping systems. **Agronomy Journal** **88** (6): 886-893.
- Einhellig, F.A. 1999. An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. Pp. 479-494. *In*: Inderjit; Dakshini, K.M.M.; Foy, C.L. (Ed.) **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton: CRC Press.
- Einhellig, F.A. 2002. The physiology of allelochemicals action: clues and views. Pp. 1-23. *In*: Reigosa, MJ. And Pedrol, N. (Eds). **Allelopathy from molecules to ecosystems**, Science Publisher Inc. Enfield, NH.
- Elix, J.A., 1996. Biochemistry and secondary metabolites. Pp. 154-180. *In*: Nash III, T.H. (Ed.). **Lichen Biology**. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Ellis, M.K.; Whitfield, A.C.; Gowans, L. A.; Auton, T.R.; Provan, W.E.A.; Lock; Smith, L.L. 1995. Inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1, 3-dione and 2-(2-chloro-4-methanesulfonylbenzoyl)-cyclohexane-1, 3-dione. **Toxicology and Applied Pharmacology** **133**:12-19.
- Endo, Y.; Hayashi, H.; Sato, T.; Maruo, M.; Ohta, T.; Nozoe, S. 1994. Confluent acid and 2'-O-methylperlatolic acid, monoamine oxidase B inhibitors in a Brazilian plant, *Himatanthus sucuuba*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** **42**: 1198-1201.
- Fahselt, D.; C. Hageman. 1994. Rhizine and upper thallus isozymes in umbilicate lichens. **Symbiosis** **16**: 95-103.
- Fahselt, D. 1996. Individuals, populations and population ecology. Pp. 181-198. *In*: Nash III, TH. (Ed). **Lichen Biology**. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Fahselt, D. 2008. Individuals and population of lichens. Pp. 252-273. *In*: T.H. Nash III (Ed.). **Lichen biology**. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ferreira, A.G.; Aquila, M.E.A. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** **12**: 175-204.
- Ferreira, A.G.; Borghetti, F. 2004. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artmed, 520p.
- Ferreira, F.A.; Silva, A.A; Ferreira, L.R. 2005. **Mecanismo de ação dos herbicidas**. *In*: V Congresso Brasileiro de algodão. Salvador-BA.
- Ferreira, R. B.; Monteiro, S.; Freitas, R.; Santos, C.N.; Chen, Z.; Batista, L.M.; Duarte, J.; Borges, A.; Teixeira, A.R. 2007. The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology** **8**: 677-700.
- Fink B. 1913. The nature and classification of lichens-II. The lichen and its algal host. **Mycologia** **5**: 97-166.

- Follmann, G.; Villagrán, V. 1965. Flechtenstoffe als Virusinhibitoren. **Die Naturwissenschaften** **51**: 543.
- Foyer, C.H.; Noctor, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic link between stress perception and physiological responses. **Plant Cell** **17**: 1866-1875.
- Green, D.R.; Reed, J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. **Science** **281**: 1309-1312.
- Friebe, A.; Roth, U.; Kuck, P.; Schnabl, H.; Schulz, M. 1997. Effects of 2-4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones on the activity of plasma membrane H⁺ ATPase. **Phytochemistry** **44** (6): 979-983.
- Gaio-Oliveira, G.; Dahlman, L.; Maguas, C.; Palmqvist, K. 2004. Growth in relation to microclimatic conditions and physiological characteristics of four *Lobaria pulmonaria* populations in two contrasting habitats. **Ecography** **27**: 13–28.
- Gao, Y.; Kennish, M.J.; Flynn, A.M.; 2007. Atmospheric nitrogen deposition to the New Jersey coastal waters and its implications. **Supplement Ecological Applications** **17**: S31–S41.
- Garcia-Junceda, E.; Vicente, C. 1986. The use of immobilized cells to stabilize orsellinate depside hydrolase of *Pseudevernia furfuracea*. **Plant Cell Reports** **5**: 155-157.
- Gardner, C.R.; Mueller, D.M.J. 1981. Factors affecting the toxicity of several lichen acids: Effect of pH and lichen acid concentration. **American Journal of Botany** **68** (1): 87-95.
- Gershenson, J. 1993. The cost of plant chemical defenses against herbivory: a biochemical perspective. Pp. 105-173. In: Bernays, E.A. (Ed.). **Plant-Insect interaction**. Boca rotaion: CRC Press, v.5.
- Giez, I.; Lange, O.L., Proksch, P. 1994. Growth retarding activity of lichen substances against the polyphagous herbivorous insect *Spodoptera littoralis*. **Biochemical Systematics and Ecology** **22**: 113–120.
- Giordano, S.; Alfano, F.; Basile, A.; Castaldo; Cobianchi, R. 1999. Toxic effects of the thallus of the lichen *Cladonia foliacea* on the growth and morphogenesis of bryophytes. **Cryptogamie Bryologie** **20** (1): 35-41.
- Glass, A.D.M. 1973. Influence of phenolic acids on ion uptake. I. Inhibition of phosphate uptake. **Plant Physiology** **51**: 1037-1041.
- Glass, A.D.M; Dunlop J. 1974. Influence of phenolic acids on ion uptake. IY Depolarization of membrane potentials. **Plant Physiology** **54**:855-858.
- Glime, J.M. 2007. Bryophyte ecology. Vol. 1. **Physiological ecology**. E-book sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. Accessed from the website: <http://www.bryo ecol.mtu.edu/>.

- Gniazdowska, A.; Bogatek, R. 2005. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiologica Plantarum** **27**: 395-407.
- Godfrey, C.R.A. 1995. **Agrochemicals from Natural Products**; Dekker: New York.
- Goldner, W.R.; Hoffman, F.M.; Medve, R.J. 1986. Allelopathic effects of *Cladonia cristatella* on ectomycorrhizal fungi common to bituminous strip-mine spoils. **Canadian Journal of Botany** **64**: 1586-1590.
- Gonzalez, V.M.; Kazimir, J.; Nimbai, C.I.; Weston, L.A.; Cheniae, G.M. 1997. Inhibition of a photosystem II electron transfer reaction by the natural product sorgoleone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **45**: 1415-1421.
- Gratao, P.L.; Polle, A.; Lea, P.J.; Azevedo, R.A. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology** **32**: 481-494.
- Green, D.R.; Reed, J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. **Science** **281**: 1309-1312.
- Guzman, G.; Xavier-Filho, L.; Pereira, E.C.G. 1984. Flujo de nutrientes em comunidades de tundra Antartica. **Boletim Antartico Chileno** **4**: 82-84.
- Hammer, S. 2003. Notocladonia, a new genus in the Cladoniaceae. **Bryologist** **106**: 162-167.
- Hale, M.E. 1967. **The Biology of Lichens**. Edward Arnold, Publishers, Ltd., London. 176 p.
- Hale-Jr., M. E. 1983. **The Biology of Lichens**. 3ed. London. Edward Arnold Pub., 90p.
- Halliwell, B., Gutteridge J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal** **219**: 1-14.
- Halliwell, B. 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. **Chemistry and Physics of Lipids** **44**: 327-340.
- Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology** **141**: 312-322.
- Harper, J.R.; Balke, N.E. 1981. Characterization of inhibition of K⁺ absorption in oat roots by salicylic acid. **Plant Physiology** **68**: 1349-1353.
- Hatzios, K.K. 1987. Biotechnology applications in weed management: Now and in the future. **Advances in Agronomy** **41**: 325-375.
- Hauck, M.; Huneck, S. 2007. Lichen substances affect metal adsorption in *Hypogymnia physodes*. **Journal of Chemical Ecology** **33**: 219-223.

- Hauck, M.; Huneck, S. 2007. The putative role of fumarprotocetraric acid in the manganese tolerance of the lichen *Lecanora conizaeoides*. **Lichenologist** **39**: 301-304.
- Heilman, A.S.; Sharp, A.J. 1963. A probable antibiotic effect of some lichens on bryophytes. **Revue Bryologique et Lichenologique** **32**: 215-219.
- Hendry, G.A.; Houghton, J.D.; Brown, S.B. 1987. Chlorophyll degradation a biological enigma. **New Phytologist** **107** (2): 255-302.
- Henriksson, E. 1957. Studies in the physiology of the lichen *Collema*. I. The production of extracellular nitrogenous substances by the algal partner under various conditions. **Physiologia Plantarum** **10**: 943-948.
- Hoagland, R.E. 2001. Microbial allelochemicals and pathogens as bioherbicidal agents. **Weed Technology** **15**: 835-857.
- Hoagland, R.E.; Williams, R.D. 2004. Bioassay – useful tool for the study of allelopathy. Pp. 315-351. *In*: Macías, F.A.; Galindo, J.C.G.; Molinillo, J.M.G.; Cutler, H.G. (Eds.). **'Allelopathy. Chemistry and mode of action of allelochemicals.'** CRC Press: Boca Raton/FL.
- Hobbs, R.J. 1985. The persistence of *Cladonia* patches in closed heathland stands. **Lichenologist** **17** (1): 103-109.
- Honegger, R. 1987: Questions about pattern formation in the algal layer of lichens with stratified (heteromerous) thalli. Pp. 59-71. *In*: E. Peveling (Ed.): **Progress and Problems in Lichenology in the Eighties**. Bibliotheca Lichenologica No. 25. J. Cramer, Berlin-Stuttgart.
- Honegger, R. 1991. Functional aspects of the lichen symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **42**: 553–578.
- Honegger, R. 1992. Lichens: mycobiont-photobiont relationships, Pp. 255–275. *In*: W. Reisser (Ed.). **Algae and Symbioses: Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interactions Explored**. Biopress, Bristol.
- Honegger, R. 1998. The lichen symbiosis: what is so spectacular about it? **Lichenologist** **30**: 193–212.
- Hyvärinen, M., Walter, B., Koopmann, R. 2003. Impact of fertilisation on phenol content and growth rate of *Cladonia stellaris*: a test of the carbon-nutrient balance hypothesis. **Oecologia** **134**: 176-181.
- Honda, N.K. 1997. **Líquens de Mato Grosso do Sul – estudo químico e avaliação da atividade biológica**. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Química Orgânica. 163 p.
- Honda, N.K. Vilegas W. 1998. A Química de Líquens. **Química Nova** **22**: 25-55.

- Huneck, S. 1973. Nature of lichen substances. Pp. 495-522. *In*: V. Ahmadjian; Hale, M.E. (Eds.): **The Lichens**. Academic Press, New York and London.
- Huneck S. 1999. The significance of lichens and their metabolites. **Naturwissenschaften** **86**: 559-570.
- Huneck, S. 2001. New results on the chemistry of lichen substances. **Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe** **81**:1-276.
- Huneck, S.; Yoshimura, I. 1996. Pp. 228-229. *In*: **Identification of Lichen Substances**, Springer-Verlag, Berlin.
- Huovinen, K.; Hilten, R.; Schantz, M. 1983. Analysis of lichen acids from extracts of *Cetraria islandica* by high performance liquid chromatography. Pp. 294. *In*: **Gesamtkongress der Pharmazeutischen Wissenschaften Die in der Arzneimitelforschung**. Abstracts.
- Huovinen, K.; Ahti, T.; Stenroos, S. 1990. The composition and contents of aromatic lichen substances in *Cladonia* section *Cladonia* and group *Furcatae*. **Bibliotheca Lichenologica** **38**: 209-241.
- IAS. 1996. International Allelopathy Society Constitution. First World Congress on Allelopathy. **A science for the Future**.
- Inderjit; Dakshini, K.M.M. 1995. Quercetin and quercetrin from *Pluchea lanceolata* and their effect on growth of asparagus bean. Pp: 86-95. *In*: Inderjit, K.M.N. Dakshini and F.A. Einhellig (Eds.). **Allelopathy: organisms, processes, and applications**. American Chemical Society, Washington, DC.
- Inderjit; Weiner, J. 2001. Plant allelochemical interference or soil chemical ecology? **Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics** **4**: 3-12.
- Inderjit; Weston, L.A. 2000. Are laboratory bioassays for allelopathy suitable for prediction of field responses? **Journal of Chemical Ecology** **26**: 2111-2118.
- Inderjit; Weston, L.A, Duke, S.O. 2005. Challenges, achievements and opportunities in allelopathy research. **Journal of Plant Interactions** **1** (2): 69-81.
- Inoue, H.; Noguchi, M.; Kubo, K. 1987. Site of inhibition of usnic acid at oxidizing side of photosystem 2 of spinach chloroplasts. **Photosynthetica** **21**: 88-90.
- Ishii-Iwamoto, E.L.; Abraham, D.; Sert, M.A.; Bontato, C.M.; Kelmer-Brancht, A.M.; Bracht, A. 2006. Mitochondria as a site of allelochemicals action. Pp. 267-284. *In*: Reigosa, M.J., Pedrol, N., González, L. (Eds.). **Allelopathy: A physiological process with Ecosistemas**. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Iskandar, I.K.; Syers, J.K. 1971. Solubility of lichen compounds in water: pedogenetic implications. **Lichenologist** **5**: 45-50.

- Jacobi, U.S.; Ferreira, A.G. 1991. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimicronata* (DC) OK. sobre espécies cultivadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 26 (7): 935-943.
- Jankay, P.; Muller, W.H. 1976. The relationships among umbelliferone, growth, and peroxidase levels in cucumber roots. **American Journal of Botany** 63 (1): 126-132.
- Jaspers, P.; Kangasjärvi, J. 2010. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. **Physiologia Plantarum** 138 (4): 405-413.
- Jiang, C.M.; Yu, G.R.; Fang, H.J.; Cao, G.M.; Li, Y.N. 2010. Short-term effect of increasing nitrogen deposition on CO₂, CH₄ and N₂O fluxes in an alpine meadow on the Qinghai-Tibetan Plateau, China. **Atmospheric Environment** 44: 2920-2926.
- Jones, D. 1988. Lichens and pedogenesis. Pp. 109-124. In: Galun, M. (Ed.). **Handbook of Lichenology**. CRC Press, Boca Raton,
- Kagan, I.A.; Rimando, A.M.; Dayan, F.E. 2003. Chromatographic separation and in vitro activity of sorgoleone congeners from the roots of *Sorghum bicolor*. **Journal of Agriculture Food and Chemistry** 51: 7589-7595.
- Kathiresan, R.; Koger, C.H.; Reddy, K.N. 2006. Allelochemicals: biological control of plant pathogens and diseases. Pp. 103-122. In: Inderjit; Mukerji, K.G. (Eds.). **Allelopathy for Weed Control in Aquatic and Wetland Systems**. The Netherlands: Springer.
- Kauppi, M., 1976. Fruticose lichen transplant technique for air pollution experiments. **Flora** 165: 407-414.
- King-Diaz, B.; Esquivel, B.; Hernandez-Terrones, M.; Lotina-Hennsen, B. 2001. Metabolitos secundarios de plantas mexicanas como posibles agentes herbicidas. Pp. 111-132. In: Bernal-Lugo, I.; Loza-Tavera, H. (Ed.) 2001. **Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas**. Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Ciudad de Mexico.
- Knox, K. 1985, "Leachate treatment with nitrification of ammonia", **Water research** 19: 895-904.
- Kohli, R.K.; Singh, H.P.; Batish, D.R. 2001. 447p. In: **Allelopathy in Agroecosystems**. Food Products Press, The Haworth Press, Inc., New York, NY.
- Kokalis-burelle, N.; Rodriguez-Kaban, R.; 2006. Allelochemicals as biopesticides for management of plant-parasitic nematodes. Pp. 15-29. In: **Allelochemicals: biological control of plant pathogens and diseases**. Springer.
- Kong, C.; Hu, F.; Xu, X. 2002. Allelopathic potential and chemical constituents of volatiles of *Ageratum conyzoides* under stress. **Journal of Chemical Ecology** 28: 1173-1182.

- Kinraide, W.T.B.; Ahmadjian, V. 1970. The effects of usnic acid on the physiology of two cultured species of the lichen alga *Trebouxia* Pyum. **The Lichenologist** **4**: 234-249.
- Lange, O.L.; Green, T.G.A; Reichenberger, H.; Hesbacher, S.; Proksch, P. 1997. Do secondary substances in the thallus of a lichen promote CO₂ diffusion and prevent depression of net photosynthesis at high water content? **Oecologia** **112**: 1-3.
- Lasceve, G.; Gaugain, F. 1990. Effects of usnic acid on sunflower and maize plantlets. **Journal Plant Physiology** **136**: 723-727.
- Latkowska, E.; Lechowski, Z.; Bialczyk, J.; Pilarski, J. 2006. Photosynthesis and water relations in tomato plants cultivated long-term in media containing (-)-usnic acid. **Journal Chemical Ecology** **32**: 2053-2066.
- Lawrey, J.D. 1977. Adaptive significance of o-methylated lichen depsides and depsidones. **The Lichenologist** **9**: 137-142.
- Lawrey, J. D., 1983. Lichen herbivory preference: A test of two hypotheses. **American Journal of Botany** **70**: 1188-1194.
- Lawrey, J.D. 1984. Lichen secondary compounds influence herbivore choice. **BioScience** **34**: 109.
- Lawrey, J.D., 1986. Biological role of lichen substances. **Bryologist** **9**: 111-122.
- Lawrey, J.D. 1993. Chemical ecology of *Hobsonia christiansenii*, a lichenicolous hyphomycete. **American Journal of Botany** **80**: 1109-1113.
- Lawrey, J.D. 1995. Lichen allelopathy: A review. Pp. 26-38. *In*: Inderjit; Dakshinin, K.M.M. (Eds.). **Allelopathy**. Washington, DC: Einhellig FA. American Chemical Society.
- Lawrey, J.D. 2009. Lichen chemical defense. Pp. 167-181. *In*: White, J.; Torre, M. (Eds.) **Diversity of Defensive Mutualisms**. Taylor & Francis Group Publishers.
- Lechowski, Z.; Mej, E.; Bialczyk, J. 2006. Accumulation of biomass and some macroelements in tomato plants grown in media with (-)-usnic acid. **Environmental and Experimental Botany** **56**: 239-244.
- Legaz, E.; Vicente, C. 1981. Location of several enzymes of L-arginine catabolism in *Evernia prunastri* thallus. **Zeitschrift für Naturforschung** **36**: 692-693.
- Legaz, M.E.; Vicente, C.; Ascaso, C.; Pereira, E.C.; Xavier-Filho, L. 1986. Pigment analysis of sun and shade populations of *Cladonia verticillaris*. **Biochemistry Systematic and Ecology** **14**: 575-58.
- Legaz, M.E.; Vicente, C. 1989. Regulation of urease activity of *Cladonia dendroides* and its photobiont by lichen phenols. **Plant Science** **63**: 15-24.

- Legaz, M.E.; Monso, M.A.; Vicente, C. 2004. Harmful effects of epiphytic lichens on trees. **Recent research development agronomy and horticulture 1**: 1-10.
- Legaz, M.E.; Millanes, A.M.; Vicente, C. 2006. Fisiologia dos Lichens. Pp. 343-388. *In*: Xavier Filho, L.; Legaz, M.E.; Vicente Córdoba, C.; Cristina Pereira, E. (Ed.). **Biologia de Líquens**. Rio de Janeiro: Ambitó Cultural.
- Liu, D.L.; Lovett, J.V. 1993. Biologically active secondary metabolites of barley. I. Developing techniques and assessing allelopathy in barley. **Journal Chemical Ecology 19**: 2217-2230.
- Lorber, P.; Muller, W.H. 1976. Volatile growth inhibitors produced by *Salvia leucophylla*: effects on seedling root tip ultrastructure. **American Journal of Botany 63**: 196–200.
- Lotina-Hennsen, B.; King-Diaz, B.; Aguilar, M.I. Hernandez Terrones MG. 2006. **Plant secondary metabolites. Targets and mechanisms of allelopathy**. Springer Netherlands, ISBN: 978-1-4020-4279-9.
- Lovett, J.V. 1982. Allelopathy and self-defense in plants. **Australian Weeds 2**: 33-35.
- Lovett, J.V.; Ryuntyu, M. 1992. Allelopathy: broadening the context. Pp. 11-19. *In*: Rizvi, S. J. H.; Rizvi, V. (Ed.) *Allelopathy: basic and applied aspects*. London: Chapman & Hall.
- Lund, M.; Christensen, T.R.; Mastepanov, M.; Lindroth, A.; Strom, L. 2009. Effects of N and P fertilization on the greenhouse gas exchange in two northern peatlands with contrasting N deposition rates. **Biogeosciences 6**: 2135–2144.
- Macías, F. A.; Marín, D.; Oliveros-Bastidas, A.; Castellano, D.; Simonet, A.M.; Molinillo, J.M.G. 2006. Structureactivity relationships (SAR) studies of benzoxazinones, their degradation products and analogues. Phytotoxicity on problematic weeds *Avena fatua* L. and *Lolium rigidum* Gaud. **Journal of Agricultural and Food Chemistry 54**: 1040–1048.
- Mallik, A.U.; Pellissier, F. 2000. Effects of *Vaccinium myrtillus* on spruce regeneration: testing the notion of coevolutionary significance of allelopathy. **Journal of Chemical Ecology 26** (9): 2197-2209.
- Mano, A.R.O. 2006. **Efeito alelopático do extrato aquoso de sementes de cumaru (*Amburana cearensis* S.) sobre a germinação de sementes, desenvolvimento e crescimento de plântulas de alface, picão-preto e carrapicho**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 102 p.
- Matson, P.; Lohse, K.A.; Hall, S.J. 2002. The Globalization of Nitrogen Deposition: Consequences for Terrestrial Ecosystems. **AMBIO: A Journal of the Human Environment 31**: 113-119.
- Manojlovic, T.N.; Solujic, S.; Sukdolak, S. 2002. Antimicrobial activity of an extract and anthraquinones from *Caloplaca schaeereri*. **Lichenologist 34**: 83-85.

- McEvoy, M.; Nybakken, L.; Solhaug, K.A.; Gauslaa, Y. 2006. UV triggers the synthesis of the widely distributed secondary lichen compound usnic acid. *Mycological Progress* **5**: 221-229.
- McEvoy, M.; Solhaug, K.A.; Gauslaa, Y. 2007. Solar radiation screening in usnic acid²⁷containing cortices of the lichen *Nephroma arcticum*. *Symbiosis* **43**: 143-150.
- McWhorter. 1921. Destruction of mosses by lichens. *Botanical Gazette* **72**: 321-325.
- Medeiros, A.R.M. 1990. Alelopatia: importância e suas aplicações. *HortiSul*, **1** (3): 27-32.
- Miró,C.P.; Ferreira, A.G.; Aquila, M.E.A. 1998. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **33**: 1261-1270.
- Modesto, K.A.; Martinez, C.B.R. 2010. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* **78**: 294–299.
- Møller, I.M.; Jensen, P.E.; Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 459-481.
- Molisch, H. 1937. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere. *Allelopathie*. Verlag, Jena: Gustav Fischer, 106 p.
- Mothes, K. 1955. Physiology of alkaloids. *Annual Review of Plant Physiology* **6**: 393-432.
- Movafegh, S.; Hoseini, S.M. 2013. ROS in plant cell: a review. *International Journal of Farming and Allied Sciences* **2**: 23-26.
- Muller, C.H. 1965. Inhibitory terpenes volatilized from *Salvia* shrubs. *Bulletin of Torrey Botanical Club* **92** (1): 38-45.
- Muller, C.H. 1969. Allelopathy as a factor in ecological process. *Vegetatio* **18**: 348-351.
- Nash, T.H. 1996. Lichen Biology – Introduction. *In*: Nash III, T. H. (Ed.). *Lichen Biology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Nimbal, C.I.; Yerkes, C.N.; Weston, L.A.; Weller, S.C. 1996. Herbicidal activity and site of action of the natural product sorgoleone. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **83**: 73-83.
- Nybakken, L.; Julkunen-Tiitto, R. 2006. UV-B induces usnic acid in reindeer lichens. *The Lichenologist* **38**: 477-485.

- Oliveira Junior, R.S. 2001. Mecanismo de ação de herbicidas. Pp. 207-260. In: Oliveira Junior, R.S.; Constantin, J. (Eds.). **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Agropecuária, p. 207-260.
- Oliveira, A.F.M. 1991. **Ação alelopática de *Cladina dendroides* Abb. (Líquén) e influência da associação da uréia na germinação de sementes de *Lactuca sativa* (alface)**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco.
- Oswiecimska, M.; Sendra J.; Janeczko, Z. 1979. Actimittotic activity of some *Cladonia* species native in Poland. II: Search for preparations showing tehe stable biological activity and cystostatic screening of dried extract. **Herba Polonica** **29**: 271-279.
- Palmqvist, K.; Dahlman, L.; Valladares, F.; Tehler, A., Sancho, L.G. Mattson J-E. 2002. CO₂ exchange and thallus nitrogen across 75 contrasting lichen associations from different climate zones. **Oecologia** **133**: 295-306.
- Pandey, D.K.; Mishra, N.; Singh P. 2005. Relative phytotoxicity of allelochemical quinol on rice (*Oryza sativa* L.) and associated aquatic weed green musk chara (*Chara zeylanica* Willd.). **Pesticide Biochemistry and Physiology** **83**: 82-96.
- Pedrol, N.; González, L.; Reigosa, M. J. 2006. Allelopathy and abiotic stress. Pp.171-209. In: Reigosa, M.J.; Pedrol, N.; González, L. (Eds). **Allelopathy: A physiological process with ecological implications**. Springer, Dordrecht, Holanda.
- Peñuelas, J.; Ribas-Carbó, M.; Giles. 1996. Effect of allelochemicals on plant respiration and oxygen isotope fractionation by the alternative oxidase. **Journal of Chemical Ecology** **22**: 801-805.
- Pereira, R.W.; Marcelli, M.P. 1989. Líquens da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. Anais do Congresso Nacional de Botânica. **Acta Botanica Brasilica** **3** (2): 89-94.
- Pereira, E.C.; Vicente, C.; Legaz, M.E.; Silva, N.H.; Silva, E.F.; Andrade, L.H.C. 1999. Production of Lichen Metabolites Through cell Immobilization by *Cladonia clathrata* Ahti & Xavier-Filho. **Phyton** **39**: 79-89.
- Pereira, E. C. 1998. **Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae a partir de imobilização celular**. Recife, 240p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal de Pernambuco.
- Peres, M.T,L.P. Mapeli, A.M.; Faccenda, O.; Gomes, A.T.; Honda, N.K. 2009. Allelopathic potential of orsellinic acid derivates. **Brazilian Archives of Biology and Technology** **52** (4): 1019-1026.
- Pérez-Urria, E.; Vicente, C. 1989. Purification and some properties of a secreted urease form *Evernia prunastri*. **Journal Plant of Physiology** **133**: 692-695.
- Pina, G. O. 2008. **Efeitos Alelopáticos de *Eugenia dysenterica* Dc (Myrtaceae) sobre a germinação, crescimento e morfoanatomia de *Sesamum indicum* L.**

(**Pedaliaceae -gergelim**), e *Raphanus sativus* (**Brassicaceae - rabanete**).
Dissertação (Mestrado em Botânica).

- Pöykkö, H.; Hyvärinen, M.; Backor, M. 2005. Removal of lichen secondary metabolites affects food choice and survival of lichenivorous moth larvae. **Ecology** **86**: 2623-2632.
- Proksa, B.; Sturdikova, M.; Pronayova, N.; Liptaj, T. 1996 (-)-Usnic acid and its derivatives. Their inhibition of fungal growth and enzyme activity. **Pharmazie** **51**: 195-196.
- Purvis, O.W.; Elix, J.A.; Broomhead, J.A.; Jones, G.C. 1987. The occurrence of copper-norstictic acid in lichens from cupriferous substrata. **Lichenologist** **19**: 193-203.
- Putnam, A.R.; Duke, W.B. 1978. Allelopathy in agrossystems. **Annual Review of Phytopathology** **16**: 43-451.
- Putnam, A.R. 1985. Weed allelopathy. Pp. 131-155. *In*: Duke, S.O. (Ed.) **Weed physiology**. Florida: CRS Press.
- Putnam, A.R.; Tang, C.S. 1986. Allelopathy: State of the science. Pp: 1-19. *In*: Putnam, A.R.; Tang, C.S. (Eds.). **The science of allelopathy**. John Wiley, New York.
- Pratley, J.E. 1996. Allelopathy in annual grasses. **Plant Protection Quarterly** **11**: 213-214.
- Pyatt, F.B. 1967. The inhibitory influence of *Peltigera canina* on the germination of graminaceous seeds and the subsequent growth of the seedlings. **Bryologist** **70**: 326-329.
- Reigosa, M.J.; Sanchez-Moreiras, A. 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences** **18**: 877-608.
- Reutimann, P.; Scheidegger, C. 1987. Importance of lichen secondary products in food choice of two oribatid mites (Acari) in an alpine meadow ecosystem. **Journal of Chemical Ecology** **13**: 363-369.
- Rice, E.L. 1984. **Allelopathy**. 2nd ed., New York, Academic Press.
- Rice, E.L. 1992. Allelopathic effects on nitrogen cycling. *In*: Rizvi, S.J.H.; Rizvi, V. (eds.). **Allelopathy: Basic and applied aspects**., London, UK: Chapman and Hall.
- Rimando, A.M.; Dayan, F.E.; Czarnota, M.A.; Weston, L.A.; Duke, S.O. 1998. A new photosystem II electron transfer inhibitor from *Sorghum bicolor* (L.). **Journal of Natural Products** **61**: 927-930.
- Rimando, A.M.; Dayan, F.E.; Streibig, J.C. 2003. PSII inhibitory activity of resorcinolic lipids from *Sorghum bicolor*. **Journal of Natural Products** **66**: 42-45.

- Rizvi, S.J.H.; Rizvi, V. 1992. Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. Pp. 443-472. In: Rizvi, S.J.H.; Rizvi, H. (Eds.) **Allelopathy: Basic and applied aspects**. London, Chapman & Hall.
- Rodrigues, B. R. M.; Tigre, R. C.; Buriel, M. L. L.; Silva, N. H.; Santos, M. G.; Pereira, E. C. G. 2011. **Potencial alelopático dos extratos acetônicos de *Cladonia salzmanii* Nyl., *Cladonia substellata* Vainio e *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. sobre *Lactuca sativa* L.** In: XIV Reunião Latino-Americana de Fisiologia Vegetal e XIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Búzios-RJ. Mudanças Climáticas Globais: Do Gene a Planta. Londrina, PR: Brazilian Journal of Plant Physiology, 2011. v. 23. p. 266-266.
- Rojas, I.S.; Latina-Hennsen, B.; Mata, R. 2000. Effect of lichen metabolites on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts. **Journal of Natural Products** **63**: 1396-1399.
- Romagni, J.G.; Meazza, G.; Nanayakkara, D.; Dayan, F.E. 2000. The Phytotoxic Lichen Metabolite, Usnic Acid, is a Potent Inhibitor of Plant *p*-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase. **FEBS Letters** **480** (2-3): 301-305.
- Romagni, J.G.; Rosell, R.C.; Nanayakkara, N.P.D.; Dayan, F.E. 2004. Allelopathy, chemistry and mode of action of allelochemicals. Pp 13-33. *In*: **Ecophysiology and potential modes of action for selected lichen secondary metabolites**. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Romeo, J.T. 2000. Raising the beam: moving beyond phytotoxicity. **Journal Chemical Ecology** **26**: 2011-2014
- Rundel, P.W. 1978. The ecological role of secondary lichen substances. **Biochemical Systematics and Ecology** **6**: 157- 170.
- Salomon, H. 1914. Über das Vorkommen und die Aufnahme einiger wichtiger Nährsalze bei den Flechten. **Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik** **54**: 309–347.
- Sampietro, D.A. **Alelopatía: concepto, características, metodología de estudio e importancia**. Disponível em: Acesso em 5 de maio de 2008.
- Sarret, G.; Manceau, A.; Cuny, D.; Van Halowyn, C.; Deruelle, S.; Scerbo, R.; Possenti, L.; Lampugnani, L.; Ristori, T.; Barale, R.; Barghigiani, C. 1998. Mechanisms of lichen resistance to metallic pollution. **Environmental Science and Technology** **32**: 3325-3330.
- Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **38**: 995-1014.
- Schatz, A. 1962. Pedogenic (soil forming) activity of lichen acids. **Die Naturwissenschaften** **49** (22): 518-519.

- Schatz, A. 1963. Soil microorganisms and soil chelation. The pedogenic action of lichens and lichen acids. **Agricultural and Food Chemistry** **11**: 112-18.
- Schreiner, O. and Sullivan, M. X. 1909. Soil fatigue caused by organic compounds. **Journal of Biological Chemistry** **6**: 39-50.
- Schumutterer, H. 1995. **The Neem Tree**. VCH Verlags-gesellschaft, Weinheim, FRG.
- Seaward, M.R.D. 1977. **Lichen Ecology**, London, Academic Press. 550p.
- Sedia, E.G.; Ehrenfeld, J.G. 2003. Lichens and mosses promote alternate stable plant communities in the New Jersey Pineland. **Oikos** **100**: 447-458.
- Seigler, D.S. 1996. Chemistry and Mechanisms of Allelopathic Interactions. **Agronomy Journal** **88** (6): 876-885.
- Silva, F.P. 2007. **Influência de *Cladonia salzmannii* na ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em rizosfera e desenvolvimento de plântulas**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco.
- Singh, H.P.; Batish, D.R.; Kohli, R.K. 2001. Allelopathy in Agroecosystems: an overview. Pp. 1-42. *In*: Kohli, R.K.; Harminder, P.S.; Batish, D.R. (Ed.) **Allelopathy in Agroecosystems**. Food Products Press, New York.
- Siqueira, J.O.; Nair, M.G.; Hammerschmidt, R.; Safir, G.R. 1991. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. **Critical Reviews in Plant Sciences** (1): 63-121.
- Slansky, F., 1979. Effect of lichen chemicals atranorin and vulpinic acid upon feeding and growth of larvae of the yellow-striped armyworm, *Spodoptera ornithogalli*. **Environmental Entomology** **8**: 865-868.
- Solhaug, K.A.; Gauslaa, Y. 2001. Acetone rinsing - a method for testing ecological and physiological roles of secondary compounds in living lichens. **Symbiosis** **30**: 301-315.
- Solhaug, K.A.; Gauslaa, Y. 2004. Photosynthates stimulate the UV-B induced fungal anthraquinone synthesis in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. **Plant Cell and Environment** **27**: 167-176.
- Soriano, U.M. **Alelopatia**. 1996. Disponível em: Acesso em: 10 maio 2001.
- Souza Filho, A.P.S.; Alves, S.M. 2002. **Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 260p.
- Souza Filho, A.P.S.; Alves, S.M.; Figueiredo, F.J.C. 2003. Efeitos alelopáticos do calopogônio em função de sua idade e da densidade de sementes da planta receptora. **Planta Daninha** **21** (2): 211-218.

- Souza Filho, A.P.S.; Guilhon, G.M.S.P.; Santos, L.S. 2010. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório – Revisão crítica. **Planta Daninha** **28**: 689-697.
- Stevens, C.J.; Duprè, C.; Dorland, E.; Gaudnik, C.; Gowing, D.J.G.; Bleeker, A.; Diekmann, M.; Alard, D.; Bobbink, R.; Fowler, D.; Corcket, E; Mountford, J.O.; Vandvik, V.; Aarrestad, P.A.; Muller, S.; Dise, N.B. 2010. Nitrogen deposition threatens species richness of grasslands across Europe. **Environmental Pollution** **158**: 2940-2945.
- Stocker-Worgotter, E. 2008. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. **Natural Products Reports** **25**:188-200.
- Syers, J. K. 1969. Chelating ability of fumarprotocetraric acid and *Parmelia conspersa*. **Plant and Soil** **31**: 205-208.
- Syers, J.K.; Iskandar, I.K. 1973. Pedogenetic significance of lichens. Pp. 225–248. *In*: Ahmadjian, V; Hale, M.E.; (Eds.). **The Lichens**. Academic Press, New York.
- Syrett, P.J. 1962. *In* R. A. Levin. **Physiology and Biochemistry of Algae**. Academic Press. New York. p. 171.
- Taguchi, H.; Sankawa, U.; Shibata, S. Biosynthesis of natural products. VI Biosynthesis of usnic acid in lichen (1). 1969. A general scheme of biosynthesis of usnic acid. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** **17**: 2054-2060.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2004. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Trad. Eliana Rebonato Santarém et al., Porto Alegre: Artmed editora, 719 p.
- Teixeira, R.R; Barbosa, L.C; Forlani, G.; Piló-Veloso, D.; Wallimar, J.; Carneiro, M. 2008. Synthesis of Phtosynthesis-inhibiting Nostoclides analogues. **Journal of agricultural and food chemistry** **56**: 2321-2329.
- Teixeira, R.R; Barbosa. 2008. **Síntese e avaliação das atividades Fitotóxica e citotóxica de compostos análogos aos nostoclídeos**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. 222p.
- Theophrastus (ca 300BC). 1916. **Enquiry into Plants and Minor Works on Odours and Weather Signs**. 2 Vols. Translated to English by Hort A, Heinemann W. London.
- Tigre, R.C. 2009. **Atividade alelopática de *Cladonia verticillaris* (Raddi.) Fr. sobre a germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L.** Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Tigre, R. C.; Rodrigues, B. R. M.; Buriel, M. L. L.; Silva, H. P. B.; Silva, N. H.; Colaço, W.; Pereira, E. C. G. 2011. **Gamma radiation effect on the allelopathic potential of *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. upon *Lactuca sativa* L.** *In*: International Nuclear Atlantic Conference, 2011, Belo Horizonte-MG. INAC.

- Tigre, R.C., Silva, N.H., Santos, M.G., Honda, N.K., Falcão, E.P.S., Pereira, E.C., 2012. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology Environmental Safety** **84**: 125-132.
- Tseng, M-H. Kuo, Y-H. Chen, Y-M. and Chou, C-H. (2003) Allelopathic potential of *Macaranga tanarius* (L.) Muell.-Arg. **Journal Chemical Ecology** **29**: 1269-1286.
- Türk, A.Ö.; Yilmaza, M.; Kıvanc, M.; Türk H. 2003. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cetraria aculeata* and its protolichesterinic acid constituent. **Zeitschrift für Naturforschung** **58**: 850–854.
- Vagts, I.; Kinder, M. 1999. The Response of Different *Cladonia* Species after Treatment with Fertilizer or Lime in Heathland. **The Lichenologist** **31**: 75-83.
- Vainshtein, E.A. 1985. Lichen acids and permeability of alga *Trebouxia erici* cells. **Fiziologiya Rastenii** **32**: 1153–1157.
- Van Herk, C.M.; Mathijssen-Spiekman, E.A.M.; De Zwart, D. 2003. Long distance nitrogen air pollution effects on lichens in Europe. **The Lichenologist** **35**: 347–360.
- Van Sumere, C.F.; Dedonder, A. 1971. The effect of phenolics and related compounds on the growth and respiration of *Chlorella vulgaris*. **Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie** **65**: 70-80.
- Vasconcelos, T. L. 2007. **Efeito do suprimento exógeno de uréia na produção de substâncias degradadoras do migmatito pelo líquen *Cladonia verticillaris***. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Geografia, Universidade Federal de Pernambuco.
- Vasconcelos, T.L.; Pereira, E.C; da Silva, N.H.; Vicente, C.; Legz, M.E. 2013. Intracellular urease activity in the lichen *Cladonia verticillaris*, and its implication for toxicity. **Ecotoxicology Environmental Safety** **98**: 310-6.
- Vartia K. O. 1973. Antibiotics in lichens. Pp. 547-561. .In: Ahmadjian V.; Hale, M.E. (Eds.) **The Lichens**. Academic Press, New York.
- Vavasseur, A.; Gautier, H.; Thibaud, M.-C.; Lasceve, G. 1991. Effects of usnic acid on the oxygen exchange properties of mesophyll cell protoplasts from *Commelina communis* L. **Journal Plant Physiology** **139**: 90–94.
- Velasco, L.O.M.; Capanema, L.X.L. 2006. O setor de agroquímicos. **BNDES Setorial** **24**: 69-96.
- Vicente, C. 1975. **Fisiologia de las substancias liquênicos**. 1. Ed. Madrid. Alhandra S.A., 162p.
- Vicente, C.; Palasi, M.; Estevez, M.P. 1978. Urease regulation mechanisms in *Lobaria pulrnonaria*. **Revue Bryologique et Lichenologique** **44**: 83-89.

- Vicente, C. L. Xavier- Filho. 1979. Urease regulation in *Cladonia verticillaris*. **Phyton** **37**: 137-144.
- Vicente, C.; Nieto, J.M.; Legaz, M. E. 1983. Induction of urease by urea analogues in *Evernia prunastri* thallus. **Physiologia Plantarum** **58**: 325-330.
- Vicente, C. 1985. **Surface Physiology of Lichens**. Pp. 11-25. In: Vicente, C.; Brown, D.H.; Legaz, M.E. (Eds.). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Vicente, C.; Legaz, M.E. 1988. Lichen enzymology. pp. 239-284. In: Galun M. (Ed.). **Handbook of Lichenology**, CRC Press. Boca Raton.
- Vilela, F.A.; Doni Filho, L., Sequeira E. 1991. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **26**: 1957-1968.
- Vitousek, P.M.; Cassman, K.; Cleveland, C.; Crews, T.; Field, C.B.; Grimm, N.B.; Howarth, R.W.; Marino, R.; Martinelli, L.; Rastetter, E.B.; Sprent, J.I. 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. **Biogeochemistry** **57**: 58:1-45.
- Vivanco, J.M.; Bais, H.P.; Stermitz, F.R.; Thelen, G.C.; Callaway, R.M. 2004. Biogeographical variation in community response to root allelochemistry: novel weapons and exotic invasion. **Ecology Letters** **7**: 285-292.
- Vyvyan, J. R. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron** **58** (9): 1631-1646.
- Xavier-Filho, L.; Paulo, M.Q.; Vicente, C.; Legaz, M.E. 1985. Phenols from *Cladonia sandstedei* analyzed by HPLC. **Cryptogamie. Bryologie, lichenologie** **6** (2):143-150.
- Xavier-Filho, L.; Legaz, M.E.; Cordoba, C.V.; Pereira, E.C. 2006. **Biologia de Líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, p. 617.
- Yano-Melo, A. 1994. **Atividade biológica de *Cladonia verticillaris* e *Cladonia substellata* sobre a germinação e desenvolvimento da plântula *Allium cepa***. 126f. Dissertação. Curso de Mestrado em Criptógamos). Departamento de Micologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco.
- Yano-Melo, A.Y.; Vicente, C.; Xavier-Filho, L. 1999. Allelopathic effect of the *Cladonia verticillaris* lichen extracts and fumarprotocetraric acid on the early growth of germinated seedlings in *Allium cepa* L. **Tropical Bryology** **17**: 133-139.
- Yuan, Z.-C.; Zaheer, R.; Finan, T.M. 2005. Phosphate limitation induces catalase expression in *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular Microbiology** **58**: 877-894.
- Wachtmeister, C.A. 1958. Studies on the chemistry of lichens. XI. Structure of picrolichenic acid. **Acta Chemica Scandinavica** **12**: 147-164.

- Waller, G.R. 1999. Introduction. In: Macias, F.A.; Galindo, J.C.G.; Molinillo, J.M.G. & Cutler, H.G. (Eds.) **Recent advances in allelopathy**. Cadiz, serv. Pub. Univ. Cadiz.
- Wardle, D.A.; Nicholson, K.S. & Ahmed, M. 1992. Comparison of osmotic and allelopathic effect of grass leaf extracts on grass seed germination and radicle elongation. **Plant and Soil** **140**: 315-319.
- Wardle, D.A.; Lavelle, P. 1997. Linkages between soil biota, plant litter quality and decomposition. Pp. 107-124. In: Cadisch, G., Giller, K.E. (Eds.). **Driven by nature: Plant litter quality and decomposition**. CAB International, Wallingford.
- Whittaker, R. ; Feeny, P.P. 1971. Allelochemicals: chemical interaction between species. **Science** **171** (3973): 757-770.
- Weidenhamer, J.D.; Hartnett, D.C.; Romeo, J.T. 1989. Density-dependent phytotoxicity: distinguishing resource competition and allelopathic interference in plants. **Journal Chemical Ecology** **26**: 613-624.
- Woodruff, H.B.; Miller, T.M. 1963. Antibiotics. Pp. 23–51. In: Hoechst, R.M. (Ed.). **Metabolic Inhibitors**. vol. 2. Academic Press, New York.
- Wu, H.W.; Haig, T.; Pratley, J.; Lemerle, D.; An, M. 2001. Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): production and exudation of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. **Journal Chemical Ecology** **27**:1691–1700.
- Zobel, A.M.; Lynch, J.M. 1997. 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** **4**: 269-276.
- Zukal H. 1879. Das Zusammenleben von Moos und Flechte. **Österreichische Botanische Zeitschrift** **29**: 189-191.

CAPÍTULO I

Potential phenolic bioherbicides from *Cladonia verticillaris* produce ultrastructural changes in *Lactuca sativa* seedlings

Submetido ao periódico: South African Journal of Botany

Potential phenolic bioherbicides from *Cladonia verticillaris* produce ultrastructural changes in *Lactuca sativa* seedlings

R.C. Tigre^a, E.C. Pereira^b, N.H. da Silva^c, C. Vicente^d, M.E. Legaz^{d*}

^a *Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil*

^b *Department of Geographical Sciences, Federal University of Pernambuco, Prof. Moraes Rego Av., CEP 50.740-901, Recife, PE. Brazil*

^c *Department of Biochemistry, Laboratory of Natural Products, Federal University of Pernambuco, Recife, PE. Brazil*

^d *Intercellular Communication in Plant Symbiosis Team, Faculty of Biology; Complutense University, 12, José Antonio Novais Av., 28040 Madrid, Spain*

*Corresponding author: Fax: +34 1 3945034

E-mail addresses: biotigre@gmail.com (R.C. Tigre), Eugenia.pereira@pq.cnpq.br (E.C. Pereira), nhsilva@uol.com.br (N.H. Silva), cvicente@bio.ucm.es (C. Vicente), melegaz@bio.ucm.es (M.E. Legaz)

Key words: Cladonia verticillaris, Lactuca sativa, depsidones, leaf, root, ultrastructure

ABSTRACT

The possibilities for using phenolics, extracted from the lichen *Cladonia verticillaris* with different organic solvents, as bioherbicides have herein been studied through observation of the ultrastructural changes produced in *Lactuca sativa* seedlings. The different extracts mainly contain protocetraric and fumarprotocetraric acids and very small amounts of atranorin. It has been observed that the roots of lettuce seedlings grow more rapidly in the presence of the phenols than in its absence. This fact is supported by a minor number of lobes and less indentation of the pavement cells as well as a major appearance of active dictyosomes in their cytoplasm. Nevertheless, seedling leaves developed in presence of these extracts show drastic degenerative changes. Intergranal lamellae of chloroplasts disappear whereas thylakoids are molten in amorphous.

Introduction

The use of traditional herbicides, that diminishes the costs of agricultural production, many times results in a negative environmental impact. Probably, this is the main reason that supports that no new herbicides with a new target site have been

commercialized in nearly 20 years (Dayyan et al. 2012). Thus, the study of plant allelochemicals is currently developed in the search of new natural herbicides in order to avoid the ecological impact that the chemically-synthesized compounds produce (Duke et al. 2002). For example, secondary metabolites extracts from leaves of *Ailanthus altissima* are powerful herbicidal and insecticidal substances. They produce a strong inhibitory effect on seed germination and plant growth of *Medicago sativa* (Tsao et al. 2002). A phytotoxin, xanthinosin, has been isolated from *Xanthium italicum*. This sesquiterpene lactone significantly affects the growth of both *Lactuca sativa* and *Amaranthus mangistanum* as well as impedes seed germination (Shao et al. 2012). The phenolic compound 3,4-dihidroxy-acetophenone, isolated from leachates of *Picea schenkiana* needles also inhibits germination and plant growth of *Lactuca sativa*, *Cucumis sativus* and *Phaseolus radiatus* (Ruan et al. 2011).

Under this point of view, lichens produce allelopathic phenolics that could be used as natural herbicides. Nieves et al. (2011) found that methanolic extracts of *Everniastrum sorocheilum* (Parmeliaceae), *Usnea roccellina* (Parmeliaceae) and *Cladonia confusa* (Cladoniaceae) inhibit germination and root growth of *Trifolium pratense*. Lecanoric, barbatic and gyrophoric acids behave as uncouplers of the photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts of tobacco and spinach (Takahagi et al. 2006; Endo et al. 1998). (-) Usnic acid inhibits the biosynthesis of both chlorophylls and carotenoids by acting on the enzyme 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxigenase, inducing death of *Lactuca sativa* seedlings (Romagni et al. 2000). The same compound as well as its (+) enantiomer inhibit transpiration and water photolysis of corn and sunflower seedlings (Lascève y Gaugain 1990; Latkowska et al. 2006; Lechowski et al. 2006; Legaz et al. 2004; Vavasseur et al., 1991).

Responses to germination and initial growth of *Lactuca sativa* (lettuce) subjected to organic extracts and purified compounds of *Cladonia verticillaris* were analyzed by Tigre et al. (2012). *C. verticillaris* extracts induce modifications of the size of leaf area and the length of seedling hypocotyl of lettuce seedlings whereas root development occurred. During growth experiments, seedlings exposed to ether or acetone extracts showed diminished hypocotyl and stimulated roots growth, compared to the controls. Increases of extract concentrations led to the formation of abnormal seedlings. The main components of these extracts, fumarprotocetraric and protocetraric

acids (Fig. 1), induce at all the assayed concentrations an increase of leaf area of lettuce seedlings, indicating a possible bioherbicide potential of these acids. In contrast, hypocotyl and root hyper-elongation was only observed in the presence of protocetraric acid.

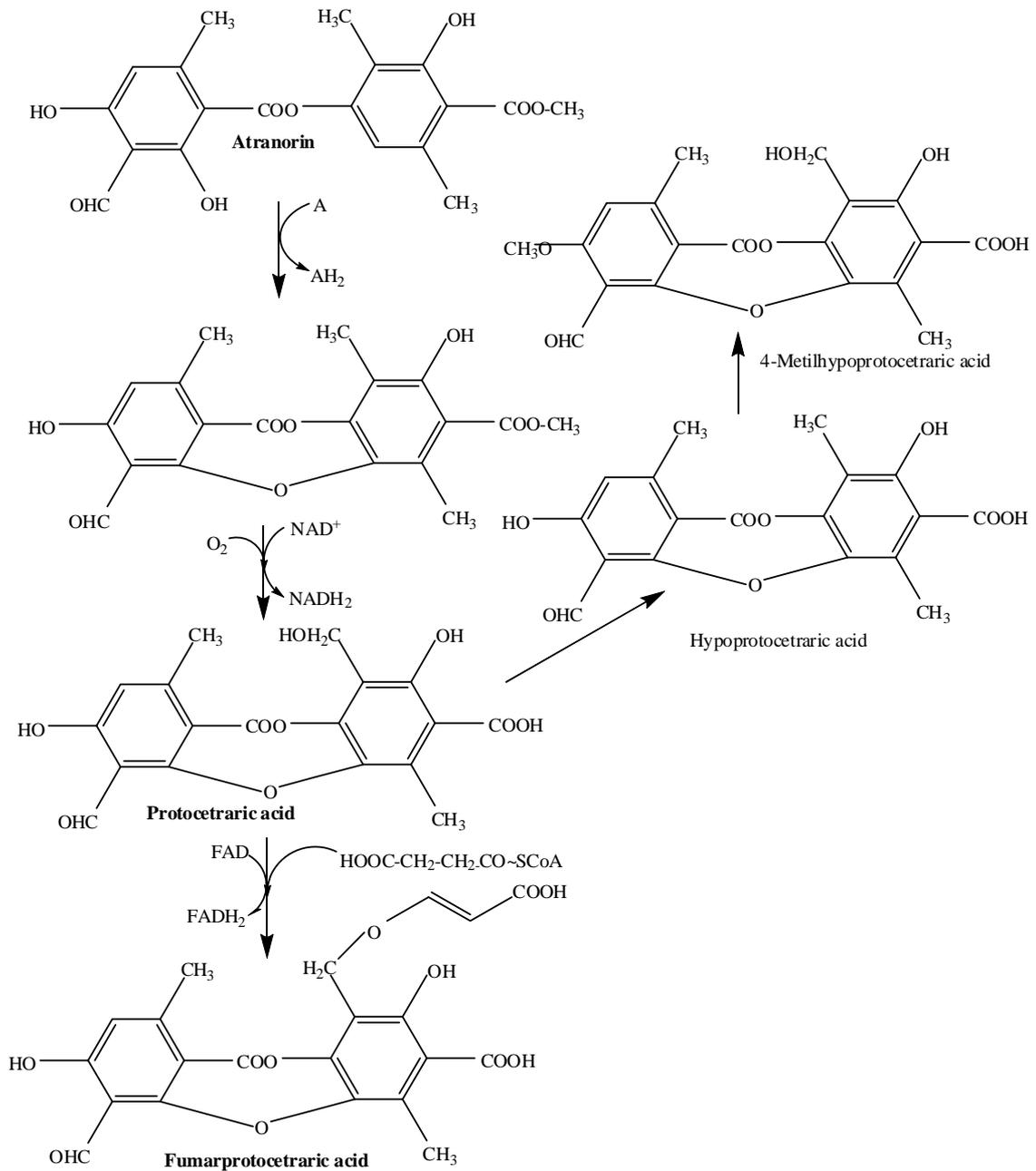


Figure 1. Scheme showing chemical structure and proposed biosynthetic pathway of atranorin-derived depsidones in the lichen *Cladonia verticillaris*

Toledo et al. (2003) reported that the substances composing the phenolic fraction of *Lethariella canariensis*, which were lixiviated by rainwater and deposited in the soil, disable the germination of cabbage, lettuce, pepper and tomato seeds. On the other hand, it has been described that lichen phenols retained by the soil can be used as a substrate for growth of soil microorganisms, that use those as a carbon source, such as usnic and perlatolic acids from *Cladonia stellaris* (Stark and Hyvärinen 2003). This biodegradability is an additional inducement to advance and to insist on the study of the use of allelochemicals as bioherbicides, since they would not accumulate irreversibly in the soils.

Since many of these lichen compounds inhibit growth, respiration and photosynthesis of sensitive plants, these changes must be accompanied by changes in the cellular ultrastructure that supports the above mentioned physiological functions, which constitutes the aim of this research.

Material and methods

Plant material

Cladonia verticillaris (Raddi) Fr., an endemic lichen species of the Brazilian littoral and of the tabuleiros of the interior of the north-east of Brazil, was used throughout this work. The samples were collected in the "Serra da Prata", from Saloá's municipality to 273 km from Recife and stored in paper boxes at 20°C± 2°C and in the dark until required.

The material was identified and the voucher specimen deposited in the Herbarium UFP of the Department of Botany of Federal University of Pernambuco, with the record 52.299. *Parmotrema dillatatum* (Vainio) Pulls, used for the extraction of protocetraric acid (PRO), was collected at the same place, being its record 39.893. Lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.) var. Grand Rapids alpha, 99.9 % of purity (lot 28371) of Island PRO, Brazil, was acquired in commercial form.

Extraction of lichen substances

Dry lichen thalli were softened and submitted to extraction in a device Soxhlet (Sobereign, VWR Co., Pennsylvania, USA) with pure acetone (Fisher Scientific, Madrid, Spain). For every 2 L of solvent, 150 g of lichen material were used. After the extraction, acetonic solution was filtered and evaporated to dryness in a concentrating SC250 Express speedvac (Thermo Electron Corporation, Asheville, NC, United Kingdom). Dry acetonic extract (AE) was re-suspended in the mobile phase used for HPLC analysis or, alternatively, used in germination experiments as described by Tigre et al. (2012). Lichen residues were new and sequentially extracted with methanol, chloroform and diethyl ether in the same way, obtaining then methanolic (ME), chloroformic (CE), and ether extracts (EE), respectively. The same procedure was applied to extract lichen phenolics from lettuce roots.

Separation and quantification of lichen phenolics

The separation and quantification of the lichen phenolics was carried out by RP-HPLC by using a Spectra Physics 8810 (Thermo Electron Corporation, Asheville, NC, USA) liquid chromatograph equipped with a SP 8810 pump, a Rheodine injector, a UV SP8490 detector and DateApex Clarity Lawsuit™ for Windows (DateApex Ltd Praha, Czech Republic) program for obtain and integrate information. The different residues obtained by successive extractions were dissolved in mobile phase to be injected. Analysis conditions were: column, reverse phase (RP) Mediterranean sea C18 of Teknokroma, S.C.L., Spain; length, 120 mm; i.d., 4.6 mm; pd, 5 µm; pressure in column, 70 bar; mobile phase, [acetonitrile]:[acetonitrile: 4 % acetic acid in water Milli-Q (80:20, v/v)] [70:30, v/v]; flux rate, 1.0 mL min⁻¹ isocratically; injection volume: 20 µL; temperature: 22°C ± 0.1 °C; wavelength of analysis: 254 nm; range of detector (absorbance units at full scale): 0.0005 units (Santiago et al., 2008).

Following the protocol of Santiago et al. (2008), the quantification of atranorin and both fumarprotocetraric and protocetraric acids was carried out by means of the interpolation of the response of the detector, in area counts, in the calibrated, corresponding straight line. The above mentioned line was constructed for each one of

the lichen phenols, calculating the relation between obtained area counts from increasing concentrations of every phenolic acid (between 290 and 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for fumarprotocetraric acid, 10-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for protocetraric acid and 30-400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for atranorin). Protocetraric acid was purified from *Parmotrema dilatatum* thalli (Vain) and fumarprotocetraric acid and atranorin from *C. verticillaris* thallus in the Laboratory of Natural Products of the Department of Biochemistry of Pernambuco's Federal University, Recife, Brazil.

Bioassay of (pre-emergent) germination

The experiment was achieved in 9 cm in diameter sterilized Petri's dishes, lined in its bottom by two leaves of filter paper, and maintained in a chamber by a photoperiod of 12 h, at $22^{\circ}\text{C} \pm 0.2$ and relative humidity of 75 %. The filter paper was moistened with 6,0 mL, 2.5 mg mL^{-1} , of an aqueous solution of all the phenols extracted by the different organic solvents (AE, ME, CE or EE). Once evaporated the solvent in air flow, the filter papers were newly moistened with 6,0 mL of distilled water. As a control, dishes moistened with distilled water were used. In every petri dish, 50 seeds of *L. sativa* were deposited on the filter paper with four replications. After 10 days germination, roots and leaves were used for transmission microscopy analysis.

Transmission electron microscopy

Roots and leaves of *L. sativa* seedlings, 10 days-old, growing in the described conditions, were fixed in Milloning buffer, pH 7.3 (Milloning 1961), containing 2,5 % (v/v) glutaraldehyde and 16 % (v/v) pformaldehyde during 6 h at 4°C , washed with the same buffer and post-fixed in a mixture of 1 % (w/v) osmium tetroxide and 3 % (w/v) potassium ferricyanide (1:1 v/v) during 2h. Later, tissues were dehydrated in a series of aqueous acetone solutions from 30 % to 100 % (v/v), by maintaining the samples immersed in those for 30 min. Finally, the samples were absorbed in Epon-812 resin for 3 days at 70°C . Ultrathin sections (60 nm), obtained with an ultramicrotome OmU-2Reichert-Jung (Wien, Austria), were examined in an transmission electron microscope Jeol 1010 (Tokyo, Japan), according to Legaz et al. (2004).

Results

HPLC analysis of the different lichen extracts revealed that fumarprotocetraric acid is the main component of the phenolic fraction (52.2 % of the total phenols) whereas atranorin accumulated in a very low amount (2.8 % of total phenolics). In the sequence of extraction of lichen phenolics using acetone — methanol — chloroform — diethyl ether, acetone extracted 71 % of total protocetraric acid, 33.7 % of fumarprotocetraric acid and 10 % total atranorin, whereas methanol extracted 14.7 %, 31.8 % and 54.5 % of these three compounds (Table 1). Any way, both depsidones, protocetraric and fumarprotocetraric acids, were always the main components of the extracted mixtures.

Table 1. Sequential extraction of phenolics from *Cladonia verticillaris* thalli with different organic solvents

Extract	ϵ'_0 *	Protocetraric acid ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Fumarprotocetraric acid ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Atranorin ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Total ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Acetonic	0.56	22.10 \pm 2.31	12,1 1 \pm 1.07	0.19 \pm 0.02	34.39
Methanolic	0.95	4.55 \pm 0.51	11.26 \pm 1.13	1.05 \pm 0.09	16.86
Chloroformic	0.40	1.02 \pm 0.07	4.26 \pm 0.14	0.61 \pm 0.04	5.89
Diethyl etheric	0.38	3.30 \pm 0.28	8.31 \pm 0.55	0.09 \pm 0.01	11.7
Total		30.97	35.94	1.94	68.84

*elutropic force coefficient

Seed germination and plant growth on different lichen extracts resulted in enhanced elongation of the main root and a restriction of leaf area, as it is shown in Table 2. Since the acetone extract contained about 50% of total phenolics extracted by successive treatments, the uptake of these phenolics was assayed by HPLC in acetonic extracts of lettuce roots. Plant tissue, after 10 days of plant growth, contained 0.206 μg of total phenolics, this is, about 1.4% of total phenolics provided to the seedlings. The main phenolic found in root tissues was protocetraric acid (132.6 μg), the most polar compound in the mixture, followed of fumarprotocetraric acid (72.6 μg). In other words, the uptake of phenolics from the media seemed to be favoured by the polarity of the molecule. This inclines to think that the enhanced growth of the main root could be

due to the action of protocetraric acid although the occurrence of fumarprotocetraric acid in roots tissues was significant.

Table 2. Main root length and leaf area of lettuce seedlings growing for 10 days on 2.5 mg mL⁻¹ acetonic extract

Treatment	Main root length (mm)	Leaf area (mm ²)
Control	36.28 ± 2.89	16.49 ± 1.74
Acetonic Extract	77.82 ± 6.32	11.98 ± 1.44
Methanolic Extract	54.91 ± 4.91	6.69 ± 1.03
Chloroformic Extract	56.24 ± 5.27	12.79 ± 1.62
Etheric Extract	55.41 ± 4.93	8.65 ± 2.89

Figure 2 shows a longitudinal cut of the apical end of a control lettuce root in which its cylindrical form and a very slightly dense to the electrons calyptra (A) can be appreciated. The apical end of the calyptra was composed by three or four layers of cells of prismatic shape (B) and big nuclei (C) whereas in the underlying cells, a great amount of perinuclear or perivacuolar statoliths can be observed (D). The subapical parenchyma was formed by multipolar cells in pavement with numerous interdigitated-shaped lobes and a great amount of indentations (E), typical of this zone of root tissue, as well as epidermal cells, developing a high activity the production of auxin (Li et al., 2011).

Logically, the same vision of pavement cells with numerous lobes and indentations was obtained in the transverse cuts of root (Fig. 3A), in which the central zone of the cell was occupied by an enormous vacuole that displaced the ergastoplasm to a perimetral location where clear storage bodies can be observed (Fig. 3B).

Germination of lettuce seeds in media that contain AE of *C. verticillaris* (2.5 mg mL⁻¹) produced plants which roots strongly elongated showing diverse cellular alterations. The cells of the calyptra were flattened, tending to be spherical before that prismatic (Fig. 4A), whereas the submeristematic cells drastically diminished its indentation pattern (Fig. 4B) and significantly increased the number of mitochondria (Fig. 4C). Many of the cells were in an active process of cellular division and

elongation (Fig. 4D) and its endoplasmic reticulum was complicated and wrapped, forming elliptical structures (Fig. 4E). A valuable number of dictyosomes were also observed, Golgi's complexes with bladders TGN (1 in Fig. 4F) perfectly differentiated, that break off from the membranous complex and moved towards the cellular membrane (2, in Fig. 4F) crossing it by inverse pinocytosis and going on to the periplasmic space (3 in Fig. 4F), in that they spilled its content in hemicelluloses and pectins. This spillage of the vesicular content would promote the enlargement of the cell wall for apposition and intussusception of new materials of wall.

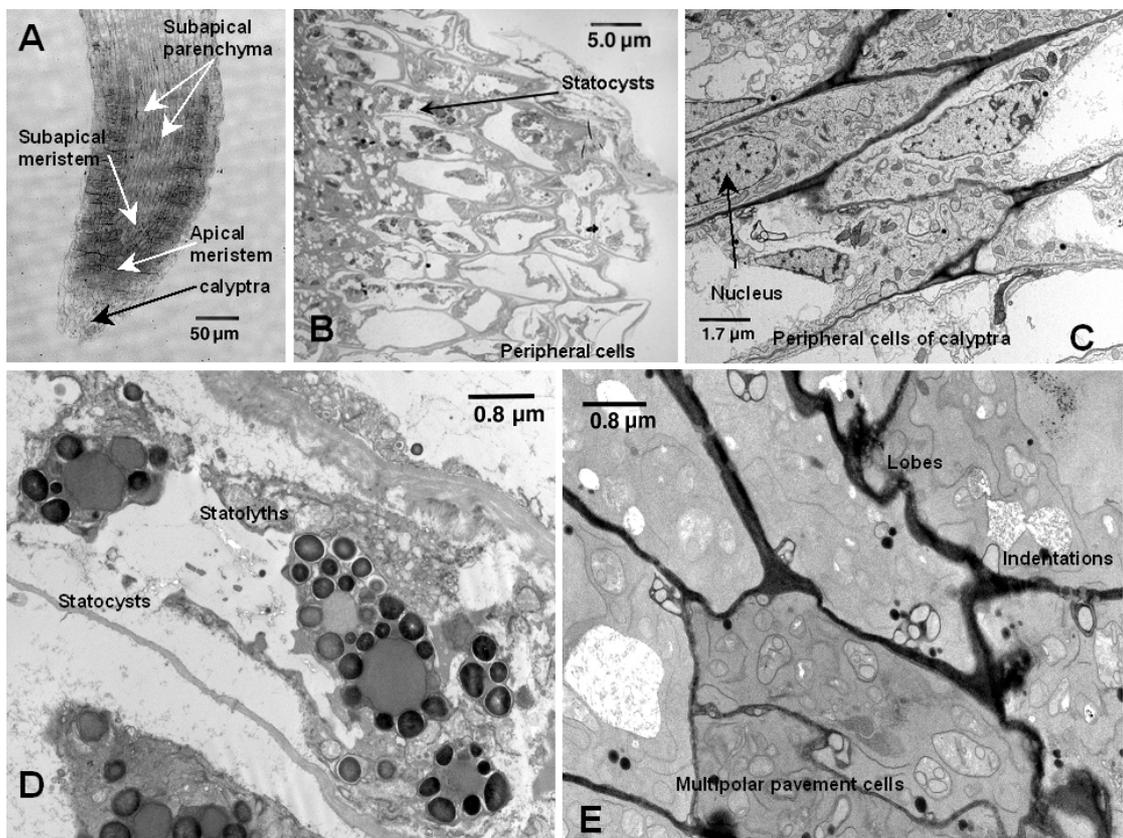


Figure. 2. Transmission electron micrographs of longitudinal cuts of *L. sativa* roots from control seeds, germinated and growing in absence of phenols of *C. verticillaris*. A) Apical segment of the root in that it can appreciated the caliptra and both apical and subapical meristems. B) Magnification of the strictly apical zone showing the two main types of cells that compose the organ, the peripheral cells and the statocysts. C) Peripheral cells of the calyptra. D) Cells of the calyptra (statocysts) showing the starchy statolyths. E) Pavement cells of the subapical parenchyma of the root showing interfinger-shaped lobes and indentations.

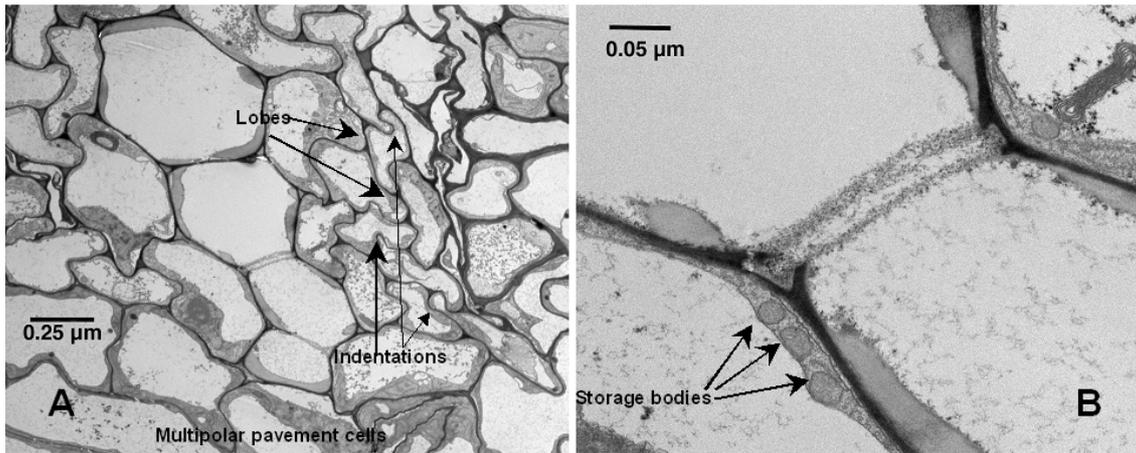


Figure 3. Transmission electron micrographs of transverse cuts of roots of *L. sativa* from seeds control, germinated and growing in absence of phenols of *C. verticillaris*. A) Pavement cells in of the subapical parenchyma of the root showing interfinger-shaped lobes and indentations. B) Magnification of a zone of the pavement parenchymatous cells.

The capture of lichen phenols by the root and its transport towards the leaves modified the pigments composition and the photosynthetic capacity of chloroplasts (Tigre, 2014). Thus, structural alterations of the mesophyll could be waited. As it was observed in the Fig. 5, the leaves of the control plants (without addition of lichen phenolics), possessed an epidermis of well-differentiated cells and abundant spongy parenchyma, typical of C3 plants, the cells of which showing chloroplasts peripherally aligned in the limit of the cytoplasm, near the internal face of the cell membrane (Fig. 5A, B and C). They possessed also abundant mitochondria perfectly structured in mitochondrial cristae, and big vacuoles (Fig. 5D). Chloroplasts showed a lenticular shape, with abundant grana and intergrana lamellae (Fig. 5E), as well as numerous lipidic bodies, very electrons–dense (Fig. 5F).

Germination of the lettuce seeds and the seedling growth on media containing lichen phenols reduced in a great manner the volume of empty spaces in the spongy parenchyma, though it supported the chloroplasts in their perimetral position (Fig. 6A). Nevertheless, the ultrastructure of these chloroplasts presented significant differences with regard to those of the plants control. Their grana were becoming wealthy

progressively (Fig. 6B), though it was not a generalized fact for all of them, at least during the chosen time of plant growth (Fig. 6C). The mitochondria progressively altered their structure of internal cristae (Fig. 6C and E) and the grana of the most degenerate chloroplasts finally appeared as semidense bodies without the internal thylacoid structure observed during the first phases of their structural changes (Fig. 6D). These modifications were in agreement with the loss of his photochemical activity, demonstrated by means of the study of the photochemical capacity of the PSII (data not shown).

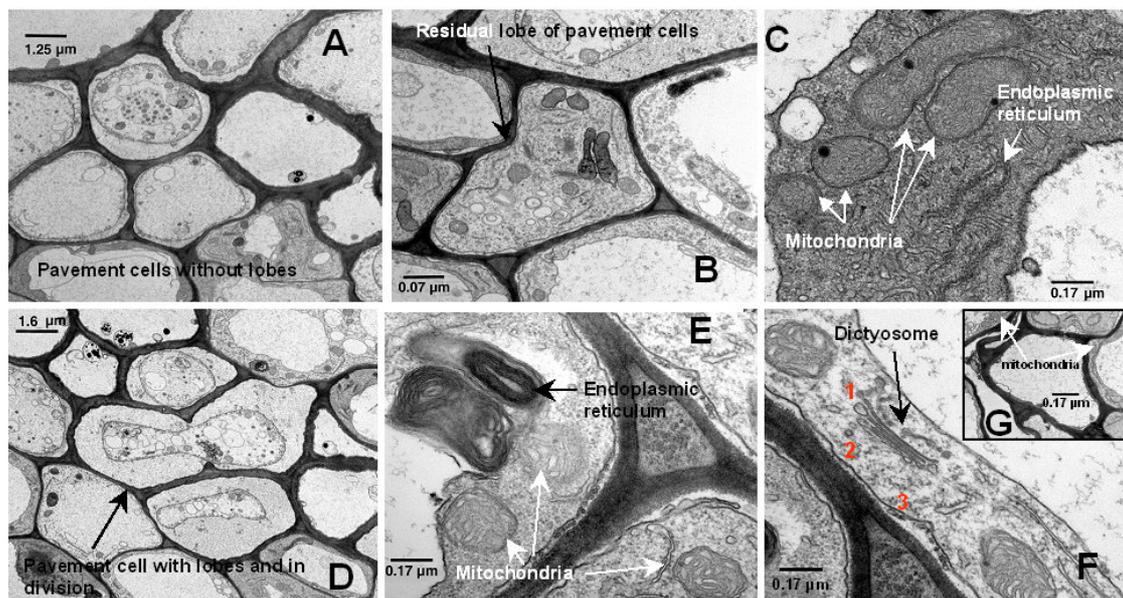


Figure 4. Transmission electron micrographs of transverse cuts of roots of *L. sativa* from seeds germinated and growing in the presence of *C. verticillaris* phenols (2.5 mg mL^{-1}) extracted with acetone. A and B) Zone of the subapical parenchyma showing pavement cells that have losing their ability to form lobes and indentations. C) Magnification of a root parenchymatous cell showing numerous mitochondria and part of the endoplasmic reticulum. D) Pavement parenchymatous cell in division after losing its capacity of indentation. E) Detail of mitochondria and endoplasmic reticulum highly folded in root parenchymatous cell. F) Detail of the peripheral cytoplasm showing a dictyosome and the sequence of traffic of the TGN vesicles towards the plasmatic membrane. Numbers 1, 2 and 3 indicate the sequence of pinocytosis toward the periplasmic space. G) Magnification of a cytoplasmic zone showing increased number of mitochondria.

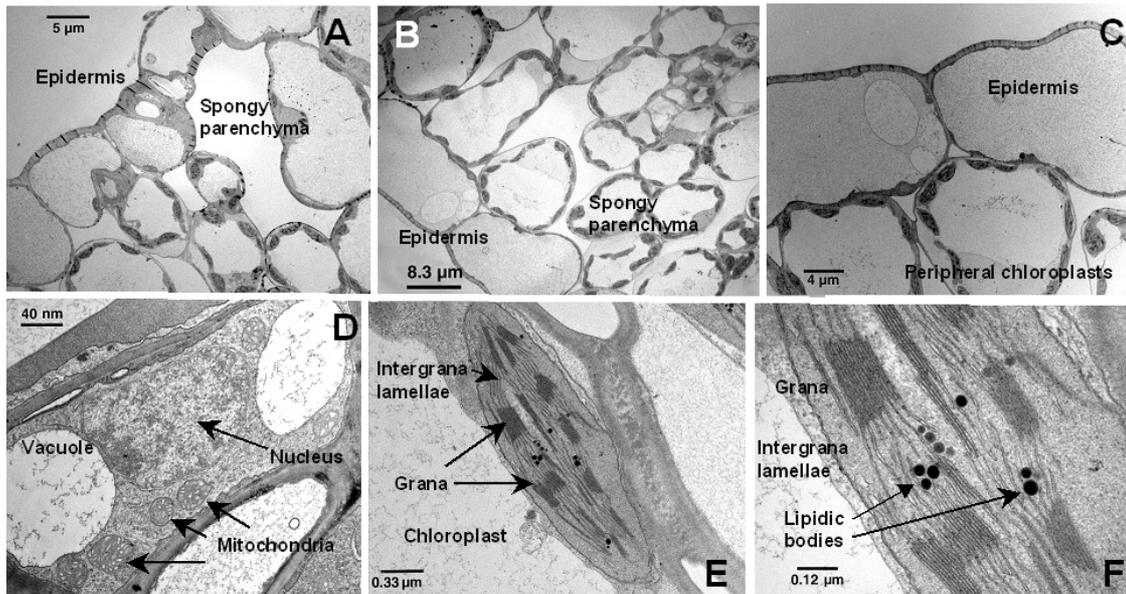


Figure. 5. Transmission electron micrographs of transverse cuts of leaves of *L. sativa* seedlings from control seeds, germinated and growing in absence of phenols of *C. verticillaris*. A) Epidermis and spongy parenchyma. B) A different zone of the same tissue showing the peripheral disposition of chloroplasts. C) Magnification of two epidermal cells and some cells of the spongy underlying parenchyma. D) Mitochondria and vacuoles of epidermal cells. E) Chloroplast of a cell from the palisade parenchyma in. F) Magnification of the chloroplast, showing intergranal lamellae, grana and lipidic bodies.

Seedlings 10 days-old growing on ME of *C. verticillaris* showed few ultrastructural variations at root level with respect to that described for those that grew on acetic extracts (Fig. 7). The pavement cells possessed few lobes and scanty indentations (Fig. 7A), and their endoplasmic reticulum showed a certain degree of disorganization (Fig. 7B). In leaves, no significant alterations in many chloroplasts occurred (Fig. 7C), though a minor number of grana was appreciated in anyone of them (Fig. 7D).

In other cases, nevertheless, chloroplasts suffered an extreme disorganization, with formation of big central, amorphous spaces that, after increasing in size, displaced the residual grana towards the periphery of the organelle (Fig. 7E). In some cases, lipidic globules very electrons-dense appeared and packages of grana were broken off

and separated from their previous organized structure (Fig. 7G and I). In the cytoplasm, a great central vacuole was formed and seemingly the number of mitochondria increased (Fig. 7F). In other cases, plasmodesmata between two neighboring cells appeared to be literally plugged by an amorphous material (Fig. 7H).

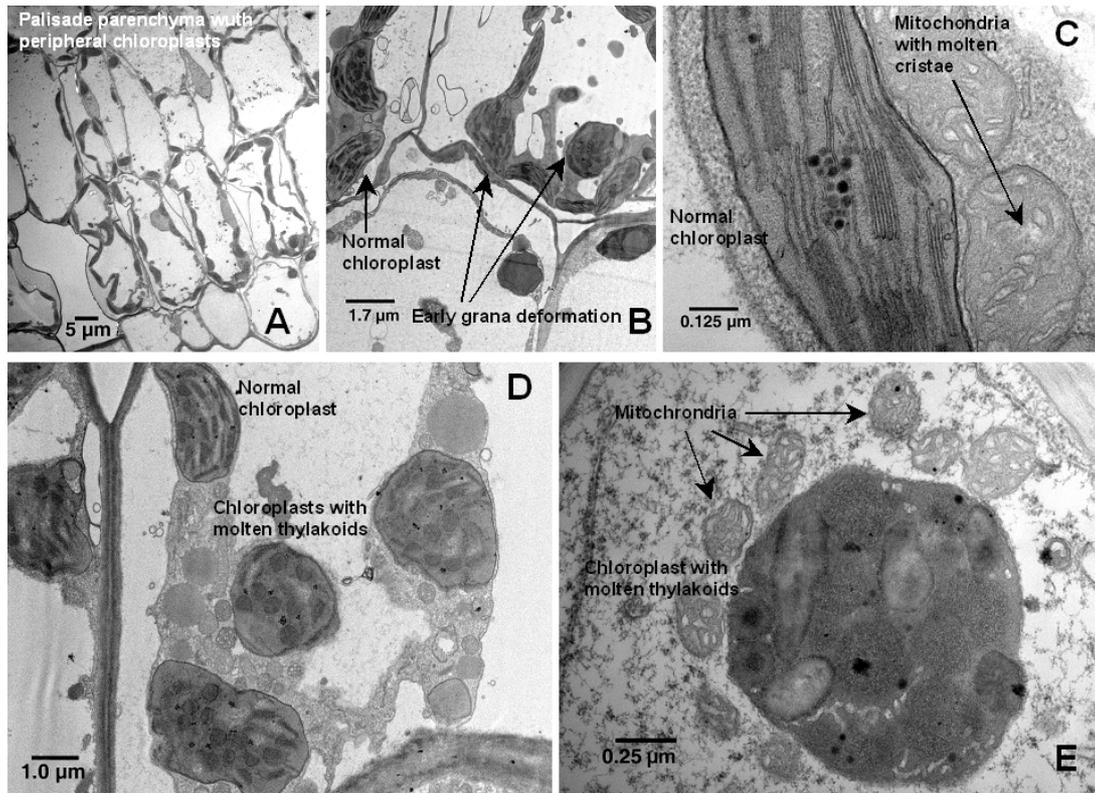


Figure 6. Transmission electron micrographs of transverse cuts of leaves of *L. sativa* seedlings from seeds germinated and growing in the presence of *C. verticillaris* phenols (2.5 mg mL^{-1}) extracted with acetone. A) Palisade parenchyma. B) Early deformation of chloroplasts of the palisade parenchymatous cells by action of *C. verticillaris* phenols absorbed by the root and translocated up to the leaves. C) Magnification of a still not modified chloroplast and of mitochondria that have eliminated their internal combs. D) Degenerate chloroplasts in those who eliminate the intergranal membranes have been eliminated and the grana fuse to form amorphous lipidic bodies in the stroma of the chloroplast. E) Magnification of a degenerated chloroplast.

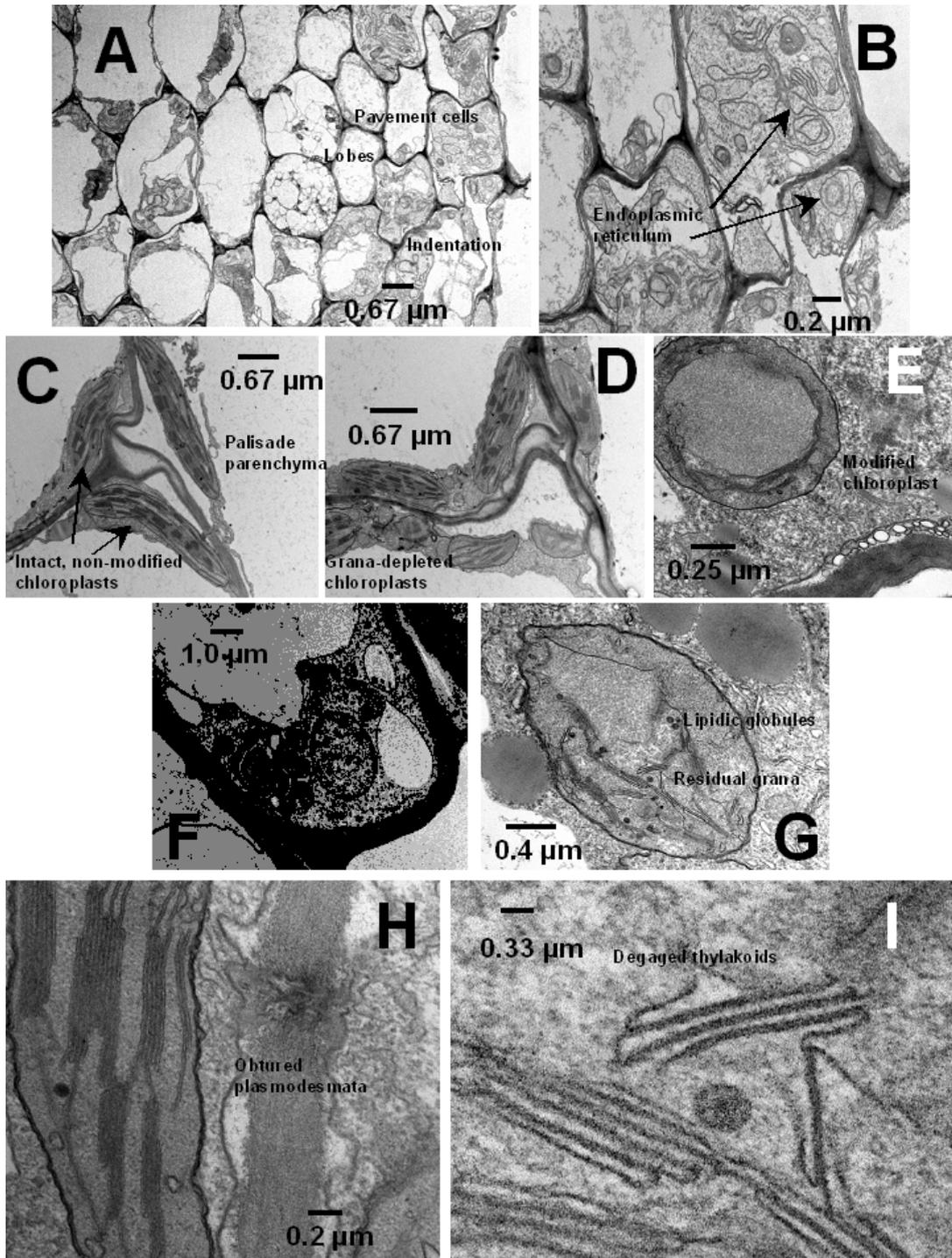


Figure 7. Transverse cuts of roots (A and B) and leaves (C to I) of *L. sativa* seedlings growing on methanolic extract of *C. verticillaris* ($2.5 \text{ mg phenols mL}^{-1}$). A) Parenchymatous, pavement turgent cells of a root showing loss of both lobes and indentations. B) Endoplasmic reticulum of the same cells. C) Cells of palisade leaf parenchyma showing intact, non-altered chloroplasts. D) Cells of palisade leaf parenchyma showing grana-depleted chloroplasts. E) Highly modified chloroplast showing a great central body and residual grana displaced to the periphery of the

organelle. F) Epidermal cell showing the nucleus and numerous mitochondria. G) Highly degraded chloroplast from palisade parenchyma cell. H) A plasmodesmata connecting two two neighboring cells and occluded by unidentified material. I) Degaged thylakoids from grana of a degraded chloroplast.

Growth of lettuce seedlings on CE presents, as more notable differences with regard to the already described above, the occurrence of cisterns of the Golgi system in the cytoplasm (Fig. 8A), a highly folded endoplasmic reticulum (Fig. 8B), disappearance of intergranal lamellae in altered cloroplasts of spongy parenchyma (Fig. 8D) and, finally, isolated packages of thylakoid membranes pushed towards the periphery of the stroma by the development of an amorphous central body (Fig. 8E), similar to that described for seedlings growing on ME. However, the chloroplast ultrastructure was preserved in some spongy parenchymatous cells (Fig. 8C).

The loss of intergranal lamellae was also observed in plants growing on phenolics extracted with diethyl ether (Fig. 9B), as well as a great increase in the number of mitochondria (Fig. 9B and C). In a more advanced degree of modification, the thylakoid packages were fusing in an extensive accumulation of lipids without internal structure, very electron–dense (Fig. 9C). Membranes of endoplasmic reticulum suffered a rearrangement for acquiring a spiral form (Fig. 9D), whereas occlusive cells and epidermis did not suffer noticeable alterations (Fig. 9A).

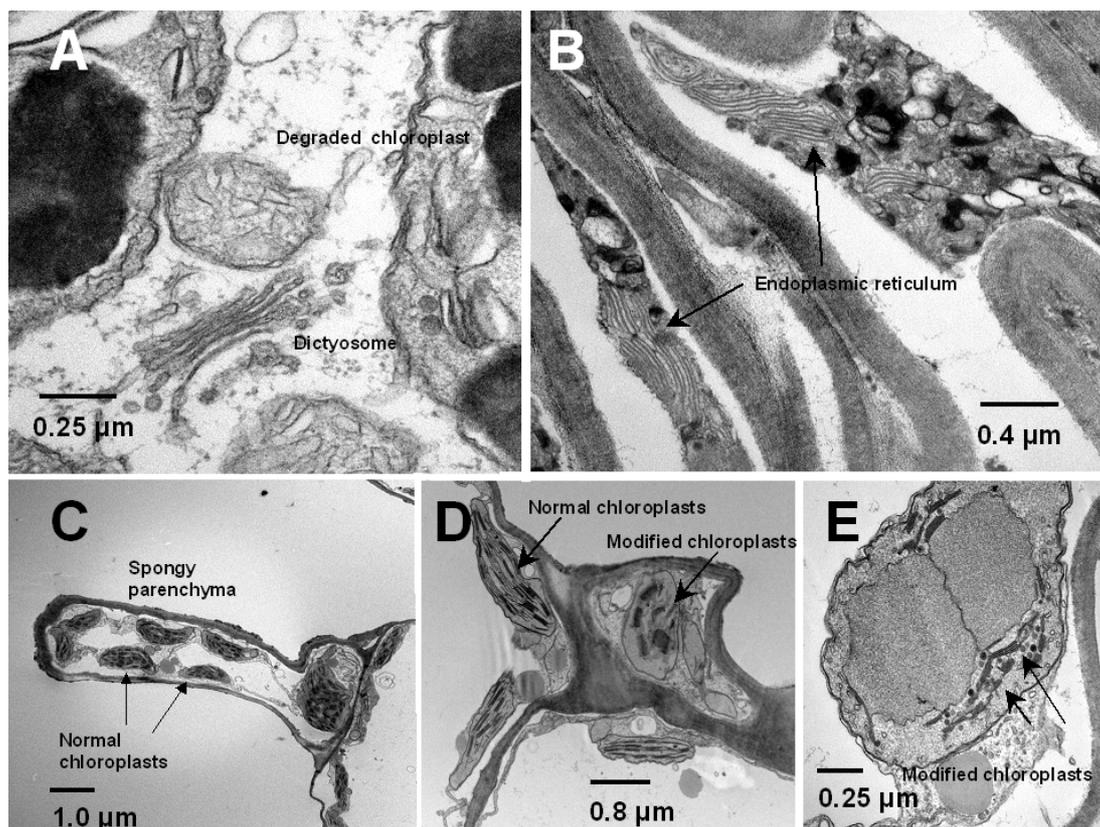


Figure 8. Transverse cuts of leaves of *L. sativa* seedlings growing on chloroformic extract of *C. verticillaris* ($2.5 \text{ mg phenols mL}^{-1}$). A) Palisade parenchymatous cell showing active dictyosome showing active dictyosome, mitochondria and a degrade chloroplast. B) Endoplasmic reticulum of the same cells. C) Cells of spongy leaf parenchyma showing intact, non-altered chloroplasts. D) Cells of palisade leaf parenchyma showing normal, unmodified chloroplasts as well as a chloroplast without intergranal lamellae. E) Highly modified chloroplast showing a great central body and residual grana displaced to the periphery of the organelle.

Discussion

In a previous paper, Tigre et al. (2012) describe that different organic extracts from the lichen *Cladonia verticillaris* accelerate root elongation and diminish the leaf area of 10 days-old lettuce seedlings and that such effects could be attributable to the presence of two depsidones, protocetraric and fumarprotocetraric acids biogenesically

related, in the different extracts. These facts have been confirmed herein (Table 2). The extraction of lichen thalli has been carried out in a serial way with acetone, methanol, chloroform and diethyl ether. In all the cases, the pair protoceraric/fumarprotocetraric acids are the main extracted phenolics, as it is shown in Table 1. The first two treatments with acetone and methanol extract about 75 % of both compounds accumulated in the lichen thalli. Nevertheless, the amount of atranorin extracted with both solvents only represents about 1.8 % of total extracted phenolics. Thus, it seems to be probable that the effects of *C. verticillaris* phenols in lettuce ultrastructure can be mainly due to the action of the depsidone pair. Although many phenolics from higher plants, mainly flavonoids, act as inhibitors of auxin transport, then inhibiting cell elongation (Brown et al., 2014), many other phenolics, mainly those derived from benzoic acid (Ferro et al., 2007) or those related to lignin precursors and catabolites, act as auxinlike molecules (Xantonadi et al., 2010), directly or by inhibition of IAA-oxidases (Jansen et al., 2014). In fact, many lichen phenolics exhibit antioxidant activities (Kosanić et al., 2011). Fumarprotocetraric and protocetraric acids show some structural analogy with phenylpropanoids and this must be the basis of the increasing root elongation shown in Table 2. For this reason, ultrastructural changes that lettuce seedlings suffer when they grow on similar extracts, containing both depsidones, have been searched in order to explain the physiological changes mentioned above.

The accelerated growth of roots, shown in Table 2, can be related to an increase of the cell volume that practically eliminate the lobes and notably diminish the number of indentations of parenchymatous cells of the root, mainly in the zone of the subapical meristem, for seedlings growing on acetone extracts of *C. verticillaris* (compare Figs. 2 and 4). These signs of active growth, derived from an increased swelling of cells, are accompanied of an increase in the number of mitochondria and a significant quantity of dictyosomes (Fig. 3). A major rate of growth must be supported by a greater energetic demand and a constant production of cell wall materials. The increase in the number of mitochondria and the appearance of dictyosomes, with TGN vesicles loaded of polysaccharides that separate of Golgi's membrane systems and emigrate across the cytoplasm (Fig. 4C and F) are in agreement to that described by Worden et al. (2012) for the synthesis and deposition of new cell wall components. More active mitochondria imply major energetic availability for accelerated cell elongation.

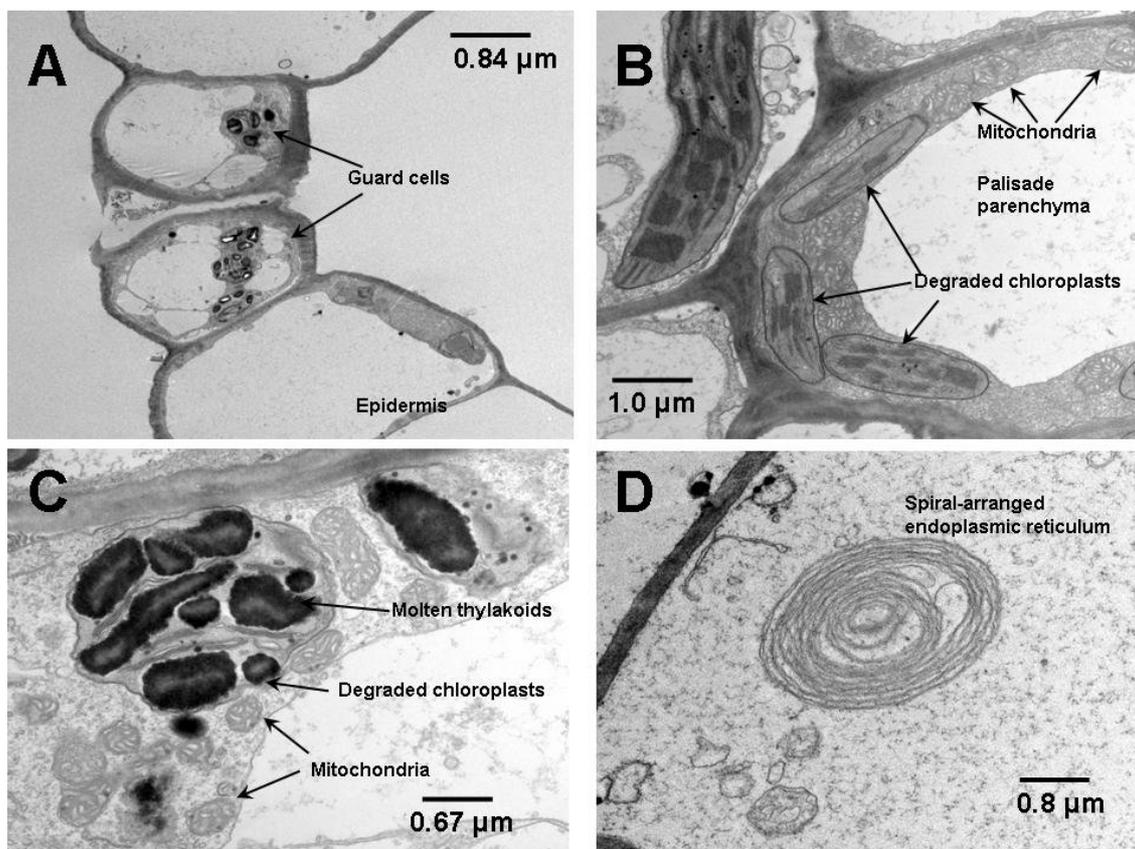


Figure. 9. Transverse cuts of leaves of *L. sativa* seedlings growing on diethyl ether extract of *C. verticillaris* ($2.5 \text{ mg phenols mL}^{-1}$). A) Leaf epidermis showing the guard cells of a stomata. B) Cells of palisade leaf parenchyma showing mitochondria chloroplasts without intergranal lamellae. C) Highly modified chloroplast showing several mitochondria and chloroplasts with molten thylakoids forming electron-dense, amorphous bodies. D) Palisade parenchymatous cell showing spiral-arranged endoplasmic reticulum.

The TGN vesicles not only contain diverse hemicelluloses and pectins, but also molecules of signalling for the activation of the cellulose synthase complexes, as described by Xion et al. (2010) for rice seedlings. On the contrary, the decrease in the leaf area, described by Tigre et al. (2012), can be correlated directly to the role of lichen phenolics as powerful inhibitors of the chlorophylls biosynthesis (Romagni et al. 2000) and of the photochemical activity of the photosystem II (Takahagi et al. 2006), as well as chlorophyllase activators (Bouaid and Vicente 1998a), which would be resulted in a significant loss of the photosynthetic ability.

These effects are supported by experimental evidences derived from studies about the internalization of lichen phenols into the xylem (Bouaid and Vicente 1998b; Legaz et al. 1988), its transport towards the leaves (Avalos et al. 1986; Bouaid and Vicente 1998b) and its permeation across the chloroplast membrane (Bouaid and Vicente 1998c), fundamentally achieved for epiphytic lichens on their phytophores. However, quantitation of lichen phenolics in lettuce leaves has not been achieved as yet due to the extreme complexity of leaves extracts. This, it is necessary to develop new protocols for cleaning the samples and separation of components.

In effect, lettuce seedlings grown for 10 days on acetonic extracts of *C. verticillaris*, containing high amounts of both protocetraric and fumarprotocetraric acids, show normal chloroplasts (Fig. 6A and B) and some few ones in which a beginning of lamellae deformation becomes visible (Fig. 6B) as well as a progressive molten of the grana up to turning into a vesicular system slightly electron-dense (Fig. 6D and E).

It is not easy to explain the effect of lichen phenols in the degradation of the membrane chloroplastic systems, although it is significant that ME, CE and EE cause some different effects on lettuce chloroplasts ultrastructure (Figs. 7-9) perhaps because de amount of fumarprotocetraric acid in these extracts us higher than that found for AE but the above mentioned phenols do not act as substrata of peroxidases (Liers et al. 2011), laccases (Laufer et al. 2006) or lipo-oxigenases (Beckett et al. 2013). On the contrary, lichen phenols have been described as powerful antioxidants (Kranter and Birtić 2005) by acting as scavenger agents on the ROS species (Pavithra et al. 2013). Many phenols of plants also behave as lipase inhibitors (Batubara et al. 2009). For all these reasons, there would be necessary to think in na interaction between phenols and membrane lipids that would produce the observed lamelar malformations rather than in an activation of degradative enzyme systems.

Conclusions

The depsidone pair composed by protocetraric and fumarprotocetraric acids causes changes in the ultrastructure of both roots and leaves of lettuce seedlings. Whereas these phenolics accelerate the growth in length of roots, with is accompanied by cell division, an increase of the volume cells and in the number of active

dictyosomes, they strongly altered and degraded chloroplast ultrastructure of both spongy and palisade leaf parenchyma. This implies that *C. verticillaris* depsidones can be considered as potential and powerful bioherbicides.

Acknowledgements

R.C. Tigre and E.C. Pereira are grateful to the Coordenadora de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES, Brazil) and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) for the scholarships and fellowships granted. This work was supported by a grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), BFU2009-11983 to C. Vicente and M.E. Legaz.

References

- Avalos A, Legaz ME, Vicente C (1986) The occurrence of lichen phenolics in the xylem sap of *Quercus pyrenaica*, their translocation to leaves and biological significance. *Biochem System Ecol* 14: 381-384.
- Batubara I, Mitsunaga T, Ohashi H (2009) Screening antiacne potency of Indonesian medicinal plants: antibacterial, lipase inhibition, and antioxidant activities. *J Wood Sci* 55: 230-235.
- Beckett RP, Zavarzina AG, Liers C (2013) Oxidoreductases and cellulases in lichens: Possible roles in lichen biology and soil organic matter turnover. *Fungal Biol* 117: 431-438.
- Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer WA, Taiz L, Muday GK (2014) Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126: 524-535.
- Bouaid K, Vicente C (1998a) Chlorophyll degradation effected by lichen substances. *Ann Bot Fennici* 35: 71-74.

- Bouaid K, Vicente C (1998b) Annual variations of the occurrence of lichen phenolics from *Evernia prunastri* in the xylem sap of *Quercus rotundifolia*. *Sauteria* 9: 257-262.
- Bouaid K, Vicente C (1998c) Effects of lichen phenolics on defoliation of *Quercus rotundifolia*. *Sauteria* 9: 229-236.
- Dayan FE, Owens DK, Duke SO (2012) Rationale for a natural products approach to herbicide discovery. *Pest Manag Sci* 68: 519-528.
- Duke SO, Dayan FE, Rimando AM, Schader KK, Aliotta Q, Oliva A, Romagni JG (2002) Chemicals from nature for weed management. *Weed Sci* 50: 138-151.
- Endo T, Takahagi T, Kinoshita Y, Yamamoto Y, Sato F (1998) Inhibition of photosystem II of spinach by lichen-derived depsides. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 2023-2027.
- Ferro N, Bultinck P, Gallegos A, Jacobsen HJ, Carbio-Dorca R, Reinard T (2007) Unrevealed structural requirements for auxin-like molecules by theoretical and experimental evidences. *Phytochemistry* 68: 237-250.
- Jansen MAK, van den Noort RE, Adilla-Tan MY, Prinsen E, Lagrimini LM, Thorneley RNF (2014) Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiol* 126: 1012-1023.
- Kosanić M, Ranković B, Vukojević J (2011) Antioxidant properties of some lichen species. *J Food Sci Technol*. 2011 48: 584–590.
- Kranner I, Birtić S (2005) A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integr Comp Biol* 45: 734-740.
- Lascève G, Gaugain F (1990) Effects of usnic acid on sunflower and maize plantlets. *J Plant Physiol* 136: 723-727.
- Latkowska E, Lechowski Z, Bialczyk J, Pilarski J (2006) Photosynthesis and water relations in tomato plants cultivated long-term in media containing (+)-usnic acid. *J Chem Ecol* 32: 2053-2066.

- Laufer Z, Beckett RP, Minibayeva FV (2006) Co-occurrence of the multicopper oxidases tyrosinase and laccase in lichens in sub-order Peltigerineae. *Ann Bot* 98: 1035-1042.
- Lechowski Z, Mejh E, Biaclyczyk J (2006) Accumulation of biomass and some macroelements in tomato plants grown in media with (+)-usnic acid. *Environ Exp Bot* 56: 239-244.
- Legaz ME, Pérez-Urria E, Avalos A, Vicente C (1988) Epiphytic lichens inhibit the appearance of leaves in *Quercus pyrenaica*. *Biochem System Ecol* 16: 253-259, 1988.
- Legaz ME, Monsó MA, Vicente C (2004) Harmfull effects of epiphytic lichens on trees. *Recent Res Devel Agric Hortic* 1: 1-10.
- Liers C, Ullrich R, Hofrichter M, Minibayeva FV, Beckett RP (2011) A heme peroxidase of the ascomycetous lichen *Leptogium saturninum* oxidizes high.redox potential sustrates. *Fungal Gen Biol* 48: 1139-1145.
- Li H, Lin D, Dhonukshe P, Nagawa S, Chen D, Friml J, Scheres B, Guo H, Yang Z (2011) Phosphorylation switch modulates the interdigitated pattern of PIN1 localization and cell expansion in *Arabidopsis* leaf epidermis. *Cell Res* 21: 970-978.
- Nieves JA, Acevedo LJ, Valencia-Islas NA, Rojas JL, Dávila R (2011) Fitotoxicidad de extractos metanólicos de los líquenes *Everniastrum sorocheilum*, *Usnea roccellina* y *Cladonia confusa*. *Glalia* 4: 96.
- Pavithra GM, Vinayaka KS, Rakesh KN, Junaid S, Dileep N, Kekuda P, Siddiqua S, Naik AS (2013) Antimicrobial and antioxidant activities of a macrolichen *Usnea pictoides*. *J Appl Pharm Sci* 3: 154-160.
- Romagni JG, Meazzab G, Dhammika-Nanayakkarac NP, Dayan FE (2000) The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Letters* 480: 301-305.

- Ruan X, Li ZH, Wang Q, Pan CD, Jiang DA, Wang GG (2011) Autotoxicity and allelopathy of 3,4-dihidroxy-acetophenone isolated from *Picea schenkiana* needles. *Molecules* 16: 8874-8893.
- Santiago R, de Armas R, Legaz ME, Vicente C (2008) Separation from *Ustilago scitaminea* of different elicitors which modify the pattern of phenolic accumulation in sugarcane leaves. *J Plant Pathol* 90: 87-96.
- Shao H, Huang X, Wei X, Zhang C (2012) Phytotoxic effects and a phytotoxin from the invasive plant *Xanthium italicum*. *Molecules* 17: 4037-4046.
- Stark S, Hyvärinen M (2003) Are phenolic leaching from lichen *Cladonia stellaris* sources of energy rather than allelopathic agent for soil microorganisms? *Soil Biol Biochem* 35: 1381-1385.
- Takahagi T, Ikezawa N, Endo T, Ifuku K, Yamamoto Y, Kinoshita Y, Takeshita S, Sato F (2006) Inhibition of PSII in atrazine-tolerant tobacco cells by barbatic acid, a lichen-derived depside. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 266-268.
- Tigre RC (2014) Investigação dos mecanismos de ação alelopática de *Cladonia verticillaris* sobre *Lactuca sativa* e *Solanum lycopersicum*. PhD Dissertation, Department of Botany, Federal University of Pernambuco, Brazil.
- Tigre RC, Silva NH, Santos MG, Honda NK, Falcão EPS, Pereira EC (2012) Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. *Ecotoxicol Environm Saf* 84: 125-132.
- Toledo FJ, García A, Estévez F, Quintana J, Bermejo J (2003) Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: phytotoxicity and antioxidative activity. *J Chem Ecol* 29: 2049-2071.
- Tsao R, Romanchuk FE, Peterson CJ, Coats JR (2002) Plant growth regulatory effects and insecticidal activity of the extracts of the tree of heaven, *Ailanthus altissima*. *BMC Ecol* 2: 1-5.

- Vavasseur A, Gautier H, Thibaud MC, Lascève G (1991) Effects of usnic acid on the oxygen exchange properties of mesophyll cell protoplasts from *Commelina communis*. J Plant Physiol 139: 90-94.
- Worden N, Park E, Drakakaki G (2012) Trans-Golgi Network—An intersection of trafficking cell wall components. J Integr Plant Biol 54: 875–886.
- Xiong G, Li R, Qian Q, Song X, Liu X, Yu Y, Zeng D, Wan J, Li J, Zhou Y (2010) The rice dynamin-related protein DRP2B mediates membrane trafficking, and thereby plays a critical role in secondary cell wall cellulose biosynthesis. Plant J 64: 56–70.
- Zandonadi DB, Santos MP, Dobbss LB, Olivares FL, Canellas LP, Binzel ML, Okorocova-Façanha AL, Façanha AR (2010) Nitric acid mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. Planta 231: 1025-1036.

CAPÍTULO II

**ESTRESSE OXIDATIVO E FOTOSSINTÉTICO DE CÉLULAS DE
Lactuca sativa E *Solanum lycopersicum* MEDIADOS POR
ALELOQUÍMICOS DE *Cladonia verticillaris***

Será submetido a: **Plant Physiology and Biochemistry**

**ESTRESSE OXIDATIVO E FOTOSSINTÉTICO DE CÉLULAS DE
Lactuca sativa E *Solanum lycopersicum* MEDIADOS POR
ALELOQUÍMICOS DE *Cladonia verticillaris***

R.C. Tigre^a, N.H. da Silva^b, C. Vicente^c, M.E. Legaz^{c*}, E.C. Pereira^{a,d}

^a Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^b Departamento de Bioquímica, Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^c Grupo Comunicação Intercelular em Simbiose Vegetal, Faculdade de Biologia; Universidade Complutense de Madrid, Av. José Antonio Novais, 12, CEP 28040, Madrid, Espanha

^d Departamento de Ciências Geográficas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP 50.740-901

*Autor correspondente: Fax: +34 1 3945034

E-mail addresses: biotigre@gmail.com (R.C. Tigre), nhsilva@uol.com.br (N.H. Silva), cvicente@bio.ucm.es (C. Vicente), melegaz@bio.ucm.es (M.E. Legaz), eugenia.pereira@pq.cnpq.br (E.C. Pereira)

RESUMO

Um dos principais atrativos dos metabólitos secundários de líquens reside na possibilidade de se conseguir novas moléculas para novos alvos moleculares, alternativos aos dos atuais herbicidas. Neste sentido, os aleloquímicos de *Cladonia verticillaris* têm sido estudados neste trabalho como fonte para modelo de bioherbicidas, através da atuação desses nas atividades do fotossistema II (PSII), e nas reações de enzimas antioxidantes de *Lactuca sativa* e *Solanum lycopersicum*. Os bioensaios realizados demonstraram que os compostos liquênicos causam estresse oxidativo nas plantas receptoras, observado pela ativação ou alteração das enzimas antioxidantes que geram o aumento da atividade do PSII e redução ou aumento da concentração dos pigmentos fotossintéticos. Observou-se que os aleloquímicos podem causar danos nos componentes celulares, levando, conseqüentemente, à disfunção celular e, finalmente, a sua morte, ou o aparecimento de lesões necróticas.

Palavras-chave: Ácido fumarprotocetrárico, ácido protocetrárico, substâncias liquênicas, bioherbicida, fotossistema II

ABSTRACT

One of the main attractions of the secondary metabolites of lichens is the possibility of getting new molecules for new molecular targets, an alternative to the current herbicides. In this sense, the allelochemicals of *Cladonia verticillaris* have been studied in this work as a source for mycoherbicides model, through the action of these in the activities of photosystem II (PSII), and the reactions of antioxidant enzymes of *Lactuca sativa* and *Solanum lycopersicum*. The bioassays showed that liquênicos compounds cause oxidative stress in host plants, observed by the activation or alteration of antioxidant enzymes that generate increased activity of PSII and reducing or increasing the concentration of photosynthetic pigments. It was observed that the allelochemicals can cause damage to cellular components, leading consequently to cell dysfunction and ultimately, the death or the onset of necrotic lesions.

Key-Words: fumarprotocetraric acid, protocetraric acid, lichen substances, bioherbicide, photosystem II

1. INTRODUÇÃO

A alelopatia em ecossistemas naturais e agrícolas está recebendo cada vez mais atenção porque os aleloquímicos reduzem significativamente o crescimento de plantas e os rendimentos das culturas vegetais (Inderjit e Duke, 2003). Essas substâncias parecem alterar uma variedade de processos fisiológicos nos quais são difíceis de separar os efeitos primários dos secundários (Inderjit e Duke, 2003; Macias *et al.*, 2007). Dessa forma, a maioria dos estudos descreve apenas os sintomas visuais ou impactos morfológicos de aleloquímicos, sem uma análise detalhada do seu modo de ação fisiológico ou bioquímico.

Fatores de estresse ambientais limitam a produtividade agrícola e muitos deles estão relacionados aos processos metabólicos. A resposta vegetal ao estresse depende da duração, severidade e a tensão aplicada (Munne-Bosch e Alegre, 2004). Estudos sobre estresse aleloquímico estão, cada vez mais, em expansão. Recentemente, o fenômeno assumiu maior importância, uma vez que pode ajudar a explicar a inibição do crescimento vegetal em interações entre espécies e na estruturação da comunidade vegetal. Ele parece ser um mecanismo ou uma estratégia utilizada pelos organismos alelopáticos para ter sucesso como invasor e, substituir espécies nativas (Vivanco *et al.*, 2004; Qin *et al.*, 2006).

Um dos mecanismos fitotóxicos mais bem caracterizados por indução de aleloquímicos é a inibição da fotossíntese e a liberação de oxigênio através de interações com componentes do fotossistema II (PSII) (Rimando *et al.*, 1998). Em alguns casos, um aleloquímico pode estar diretamente envolvido na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), frente a qual o aumento das enzimas antioxidantes é uma resposta secundária. Em outros casos, os aleloquímicos podem diretamente inibir a oxidação de enzimas, de alguma forma, deixando a planta vulnerável a danos oxidativos (Vivanco *et al.*, 2004). Portanto, o atraso na germinação das sementes ou crescimento das plantas ocasionados por aleloquímicos é, muitas vezes, o resultado final da inibição específica de sítios de enzimas chave (Gniazdowska e Bogatek, 2005).

A diversidade de aleloquímicos os torna ferramentas promissoras, pois possuem propriedades específicas para descobrir sítios-alvo em plantas receptoras, podendo apresentar alto potencial para o controle de plantas daninhas, sendo fonte potencial para descoberta de novas moléculas de herbicidas menos agressivas ao ecossistema (Souza Filho, 2006; Morales *et al.*, 2007). Mesmo que eles inibam a fotossíntese, ou respiração das plantas como um todo, podem também ligar-se às proteínas em locais diferentes dos usualmente utilizados pelos herbicidas sintéticos (Dayan *et al.*, 2009) e, geralmente, esses compostos apresentam baixa toxicidade aos organismos não alvo de controle.

Visto que alguns aleloquímicos rapidamente despolarizam a membrana celular, aumentando a permeabilidade da membrana, induzindo a peroxidação lipídica, e provocando um rompimento celular generalizado que conduz à morte da célula (Devi e Prasad, 1996; Yu *et al.*, 2003) e, e que os extratos de *Cladonia verticillaris* inibem e estimulam a germinação e crescimento, e geram a morte de plântulas de *Lactuca sativa* dependendo do extrato e da concentração utilizada (Tigre *et al.*, 2012), é possível que essas alterações fisiológicas e bioquímicas sejam consequências da perturbação da taxa fotossintética e de danos oxidativos.

O forte potencial alelopático de *Cladonia verticillaris* (Tigre *et al.*, 2012) e o conhecimento de que os aleloquímicos são seletivos em suas ações levou ao objetivo deste trabalho: avaliar a atividade do fotossistema (PSII) e do estresse oxidativo de

Lactuca sativa var. Grand Rapids L. e *Solanum lycopersicum* Mill. var. Santa Cruz Kada, mediante a presença dos aleloquímicos de *Cladonia verticillaris*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Cladonia verticillaris, espécie de líquen endêmica do Brasil, foi coletada manualmente no município de Saloá (PE) a 273 km de Recife, área de Cerrado (tabuleiro). E os espécimes foram acondicionados em caixas de papel à temperatura ambiente ($28^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$), até a realização dos experimentos. O material foi identificado e sua exsiccata depositada no herbário UFP do Departamento de Botânica da UFPE com o registro 52.299. *Parmotrema dilatatum* (Vainio) Hale, usada para extração do ácido Protocetrárico (PRO), foi coletada no mesmo local, sendo seu registro UFP 39.893. Sementes de *Lactuca sativa* var. Grand Rapids L. e *Solanum lycopersicum* Mill. var. Santa Cruz Kada foram adquiridas comercialmente da Isla Pak, Porto Alegre, Brasil.

2.2. Extração dos aleloquímicos de *Cladonia verticillaris*

Talos líquênicos secos foram submetidos a extração em série em Soxhlet, utilizando-se solventes em série eluotrópica: com éter, clorofórmio e acetona. Os solventes foram obtidos da Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, Brasil. Para cada 2,0 L de cada solvente, foram utilizados 150 g de *C. verticillaris*. Após a extração, as soluções foram filtradas e evaporadas a vácuo.

2.3 Isolamento e purificação do ácido fumarprotocetrárico (FUM) e do ácido protocetrárico (PRO)

O principal componente da espécie em estudo, o FUM, foi isolado e purificado a partir do extrato acetônico (EA) de *C. verticillaris*. Este, após concentrado, foi lavado em funil poroso G-4 com acetona, como descrito por Pereira (1998). PRO foi extraído do líquen *Parmotrema dilatatum* (Vain.) Hale, utilizando diclorometano, seguido por acetona à temperatura de aproximadamente 45°C , como descrito por Tigre *et al.* (2012). A atranorina (ATR) foi obtida comercialmente da Sigma Química LTDA, Brasil.

2.4 Separação e quantificação dos aleloquímicos de *Cladonia verticillaris*

A separação e quantificação dos aleloquímicos majoritários foi realizada por RP-HPLC em um cromatógrafo líquido usando Spectra Physics 8810 (Thermo Electron Corporation, Asheville, NC, USA), equipado com uma bomba SP 8810, um injetor Rheodine, um detector UV-Visível SP8490 e o programa DateApex Clarity Lite™ para Windows (DateApex Ltda., Praha, Czech Republic) para obtenção e integração dos dados. Os extratos etéreos (EE), clorofórmicos (EC) e EA foram dissolvidos em fase móvel antes de serem injetados. As condições de análises foram: Coluna de fase reversa (RP), Mediterranea Sea C18 de Teknokroma, S.C.L., Espanha; dp, 5 µm, L, 120 mm; d.i., 4,6 mm; pressão em coluna, 70 bar. Fase móvel [acetonitrila]:[acetronitrila: ácido acético a 4% em água Mili-Q (80:20, v/v)] [70:30, v/v], isocrática a 1 mL·min⁻¹. Volume de injeção: 10 µL. Temperatura 22°C±0,1°C. Comprimento de onda: 254 nm. Taxa de detecção: 0,0005 unidades (Santiago *et al.*, 2008). A quantificação da ATR, FUM e PRO se realizou por meio da interpolação da resposta do detector, em contas de área e, na correspondente reta de calibração. Esta foi construída com cada aleloquímico, calculando a reação entre a conta de área obtida a partir de concentrações crescentes de cada composto (entre 290 e 400 µg·mL⁻¹ para FUM, 10-500 µg·mL⁻¹ para PRO e 30-400 µg·mL⁻¹ para ATR).

2.5 Bioensaio de germinação (Pré-emergente)

Os testes foram realizados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo duas folhas de papel de filtro umedecidas com 5 mL por placa de EE, EC e EA a 1,0 e 2,5 g·dm⁻³ e de FUM e PRO a 0,1 e 1,0 g·dm⁻³, distribuídos uniformemente, com três repetições. As placas com os papéis foram esterilizadas. O controle negativo foi obtido com o uso de água destilada (CTRL) e o controle positivo pela utilização do herbicida clortoluron (HC) na concentração 0,1 e 0,2 g·dm⁻³. Posteriormente foram semeadas em cada placa 50 sementes de *L. sativa* ou *S. lycopersicum*. O experimento foi conduzido em câmara de germinação com temperatura de 22°C±0,2, fotoperíodo de 12 h e umidade relativa de 75% por um período de 12 dias para *L. sativa* e 18 dias para *S. lycopersicum* (espécies-alvo).

2.6 Bioensaio de crescimento (Pós-emergente)

Foi realizado semelhante ao bioensaio pré-emergente, porém as sementes foram germinadas previamente em água destilada até a protusão radicular de 2 mm (Brasil, 2009), quando foram transferidas para as soluções-teste.

2.7 Isolamento das membranas tilacoidais e medida da reação de Hill

A preparação da suspensão das lamelas cloroplastídicas foi realizada de acordo com o protocolo de Trebest (1972) com modificação que consistiu na maceração a frio de 40 mg de folhas das espécies-alvo em 1mL de tampão fosfato sódico (TFS) 25mM pH 6,9, contendo KCl 30 mM e sacarose 400 mM. Este homogenado foi centrifugado a 1.000 x g durante 10 min. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 1,0 mL do mesmo tampão. Estas amostras foram mantidas a 4°C até sua imediata utilização.

A determinação da reação de Hill foi realizada na mistura de 500 µL da suspensão de lamelas tilacoidais e 500 µL de TFS 25 mM, pH 6,9. Em espectrofotômetro, uma vez ajustado o “zero” de absorbância a 600nm, adicionaram-se 75 µL de 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) 0,52 µM e imediatamente submeteu-se a amostra a uma fonte luminosa de 750 µmol.m⁻².s⁻¹ a uma distância de 20 cm, calculando o delta de absorbância em função do tempo (Trebest, 1972). A atividade do Fotossistema II (PSII) foi expressa pela variação da absorbância a 600nm por minuto e µg de clorofila a+b.

2.8 Determinação dos pigmentos fotossintéticos

Alíquotas de 400 µL da suspensão de lamelas cloroplastídicas, isoladas segundo o protocolo citado no item 2.7, foram adicionadas a 400 µL de acetona P.A. A amostra foi homogeneizada em vórtex e centrifugada a 8.500 x g por 10 min., descartando o *pellet* após centrifugação. Foram realizadas leituras no sobrenadante nas absorbâncias a 480, 649, 665 e 710 nm em um espectrofotômetro Unicam Helios β (Thermo Fisher Sci.Inc., Rockford, IL, USA), o branco consistiu em acetona a 50% (v/v). A concentração de moléculas de pigmentos foi calculada usando as expressões descritas por Pompelli *et al.* (2013).

2.9 Determinação das atividades enzimáticas peroxidase, polifenoloxidase e catalase

2.9.1 Obtenção dos extratos livres de células (ELC)

Os ELC foram obtidos através da maceração a frio de 40 mg de folhas das espécies-alvo em 1mL de TFS 75 mM, pH 6,9. O homogenato foi centrifugado a 19.000 x g por 20 min., a 4°C. Posteriormente o *pellet* foi descartado e no sobrenadante foram quantificadas as atividades enzimáticas e a determinação de proteínas.

2.9.2 Determinação de concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951) com modificações para eliminação do excesso de fenóis (Potty, 1969). Para isto, foram utilizados 200 µL de ELC, que foram precipitados com 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v) e centrifugados a 15.000 x g por 15 min. a 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado com 300 µL de TFS mM, pH 6,9, sendo neutralizado com 22 µL de NaOH 0,1 N. A partir deste extrato foram quantificadas as proteínas utilizando soroalbumina bovina como padrão.

2.9.3 Determinação das atividades enzimáticas

2.9.3.1 Atividade peroxidase – POD (EC 1.11.1)

Alíquotas de 50 µL de ELC foram adicionadas a 440 µL de TFS 75 mM, pH 6,9 e 50 µL de pirogalol 200 mM. Essa mistura foi homogenizada e imediatamente foram realizadas medidas de absorvância a 420nm a 25°C, ajustando a “zero”. Posteriormente foram adicionados 50 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 200 mM, medindo-se, em seguida, a variação de absorvância no tempo para medir a formação de purpurogalina.

2.9.3.2 Atividade polifenoloxidase – PPO (EC 1.14.18.1)

Para mistura desta reação foram utilizados 400 µL de TFS 75 mM, pH 6,9 e 50 µL de ELC que foram medidos a 420 nm a 25°C ajustando a “zero” de absorvância. Em seguida, foram adicionados 50 µL de pirogalol 200 mM, medindo a quantidade de purpurogalina formada em função do delta de absorvância em relação ao tempo.

2.9.3.3 Atividade catalase – CAT (EC 1.11.1.6)

A mistura desta reação foi obtida a partir de 400 µL de TFS 75 mM, pH 6,9 e 50 µL de ELC. Uma vez homogenizada, se ajustou o “zero” de absorbância a 240nm a 25°C e em seguida foram adicionados 50 µL de H₂O₂ 200 mM medindo a absorbância a cada 30 s, por 5 min.

As atividades enzimáticas de POD, PPO e CAT foram determinadas pelo método descrito por Kar e Mishra (1976) com as modificações descritas nos itens 2.9.3.1, 2.9.3.2 e 2.9.3.3, respectivamente. A unidade da atividade específica de cada enzima se definiu pela variação de absorbância em função do tempo, por massa (mg) de proteínas.

2.10 Detecção da morte celular e peroxidação em células de *L. sativa*

A morte celular foi determinada pela coloração das raízes e folhas de *L. sativa* em solução de azul de Evans (0,025% azul de Evans [p/v] em mL de CaCl₂ a 100 mM de, pH 5,6) durante 10 min. (Yamamoto *et al.*, 2001). As folhas e raízes coradas foram lavadas três vezes com CaCl₂ a 100 mM (pH 5,6) e, em seguida, observadas sob um microscópio óptico (Olympus BX51). Um total de cinco partes individuais foram examinadas. As células mortas foram evidenciadas pela coloração azul, em contraste com as células saudáveis, que se apresentaram transparentes.

2.11 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso com três repetições. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e quando foram significativos, aplicou-se o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

3.1 Atividade Fotossintética (Pré-emergente)

A concentração dos pigmentos fotossintéticos e da atividade do PSII de *L. sativa* e *S. lycopersicum* variou em função do extrato e da concentração, apresentando ação distinta em ambas as espécies (Fig. 1 e 2).

Em *L. sativa*, o teor de clorofila a (Chl-a) foi reduzido pelo EE 2,5 g.dm⁻³ (88,46%), EA 2,5 g.dm⁻³ (84,44%) e PRO 1,0 g.dm⁻³ (99,25%), demonstrando que PRO causa maiores degradações ou danos à síntese de Chl-a que HC, que não diferiu do CTRL (Fig. 1A). Porém, em *S. lycopersicum*, este mesmo parâmetro foi estimulado por EA 2,5 g.dm⁻³ (421,73%) e por HC 0,2 g.dm⁻³ (265,21%), evidenciando que os aleloquímicos presentes em EA apresentam ação similar ao herbicida, independente da espécie. Em *S. lycopersicum*, a Chl-a foi o único parâmetro onde o HC diferiu do CTRL. A concentração de clorofila b (Chl-b) em *L. sativa* foi reduzida por HC 0,2 g.dm⁻³ (63,20%), EA 2,5 g.dm⁻³ (82,07%), EE 2,5 g.dm⁻³ (87,73%), FUM 0,1 g.dm⁻³ (97,16%) e PRO 0,1 e 1,0 g.dm⁻³ (99,8%), sendo os aleloquímicos responsáveis pelas maiores reduções em relação ao HC (Fig. 1B); e este foi o único parâmetro que diferiu o HC do CTRL nessa espécie. Contudo, em *S. lycopersicum* este fator não foi significativo (Fig. 2B). A concentração de carotenoides (Car) em *L. sativa* foi reduzida apenas por PRO 1,0 g.dm⁻³ (97,77% - Fig. 1C) e sua síntese estimulada por EA 2,5 g.dm⁻³ (393,54%) em *S. lycopersicum* (Fig. 2C). Apesar de terem sido evidenciados apenas resultados redutores sobre o teor de Chl-a (exceção de EC 1,0 g.dm⁻³) e Chl-b em *L. sativa*, a clorofila total (Chl-total) apresentou respostas positivas e negativas (Fig. 1D), sendo o maior efeito redutor ocasionado pelo PRO (99,88%) e pelo EE 2,5 g.dm⁻³ (86,99%), podendo esta ação do EE ser consequência das interações aleloquímicas FUM/ATR ou PRO/ATR, uma vez que este extrato apresentou as maiores interações (Tab. 1) e o efeito estimulador foi ocasionado apenas pelo EC 1,0 g.dm⁻³, que incrementou a produção deste fator em até 44,39%. Em *S. lycopersicum* somente o HC 0,2 g.dm⁻³ induziu o aumento da produção de Chl-total, sendo este estímulo de 196,66% (Fig. 2D).

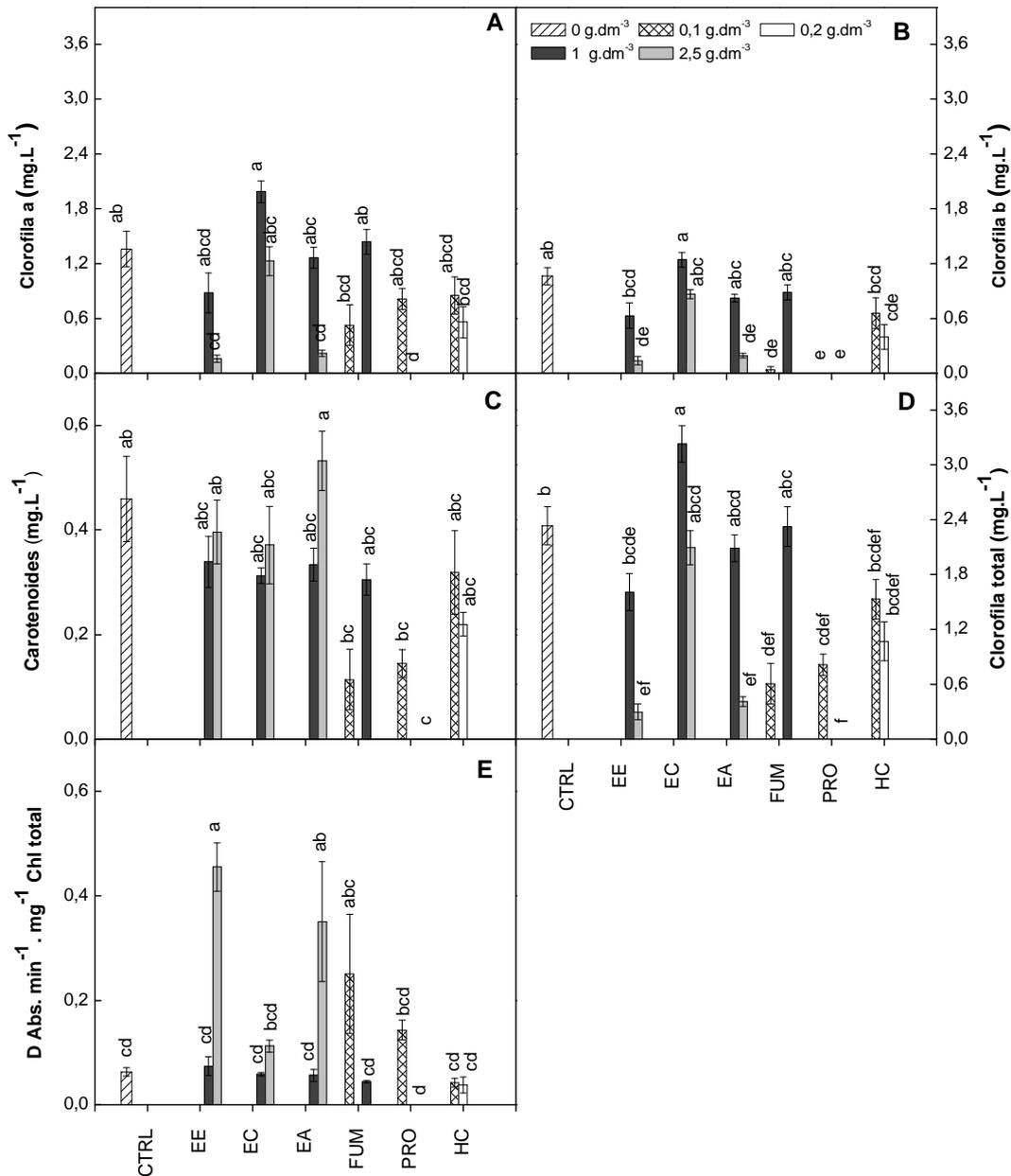


Figura 1. Valores médios da concentração de clorofila a (A), clorofila b (B), carotenoides (C), clorofila total (D) e atividade do fotossistema II, PSII (E) de plântulas de *Lactuca sativa* germinadas em diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* (EE: extrato etéreo, EC: extrato clorofórmico e EA: extrato acetônico) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³, e seus aleloquímicos isolados (ácido fumarprotocetrárico: FUM e ácido protocetrárico: PRO) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 12 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05), médias ± SE, n = 3.

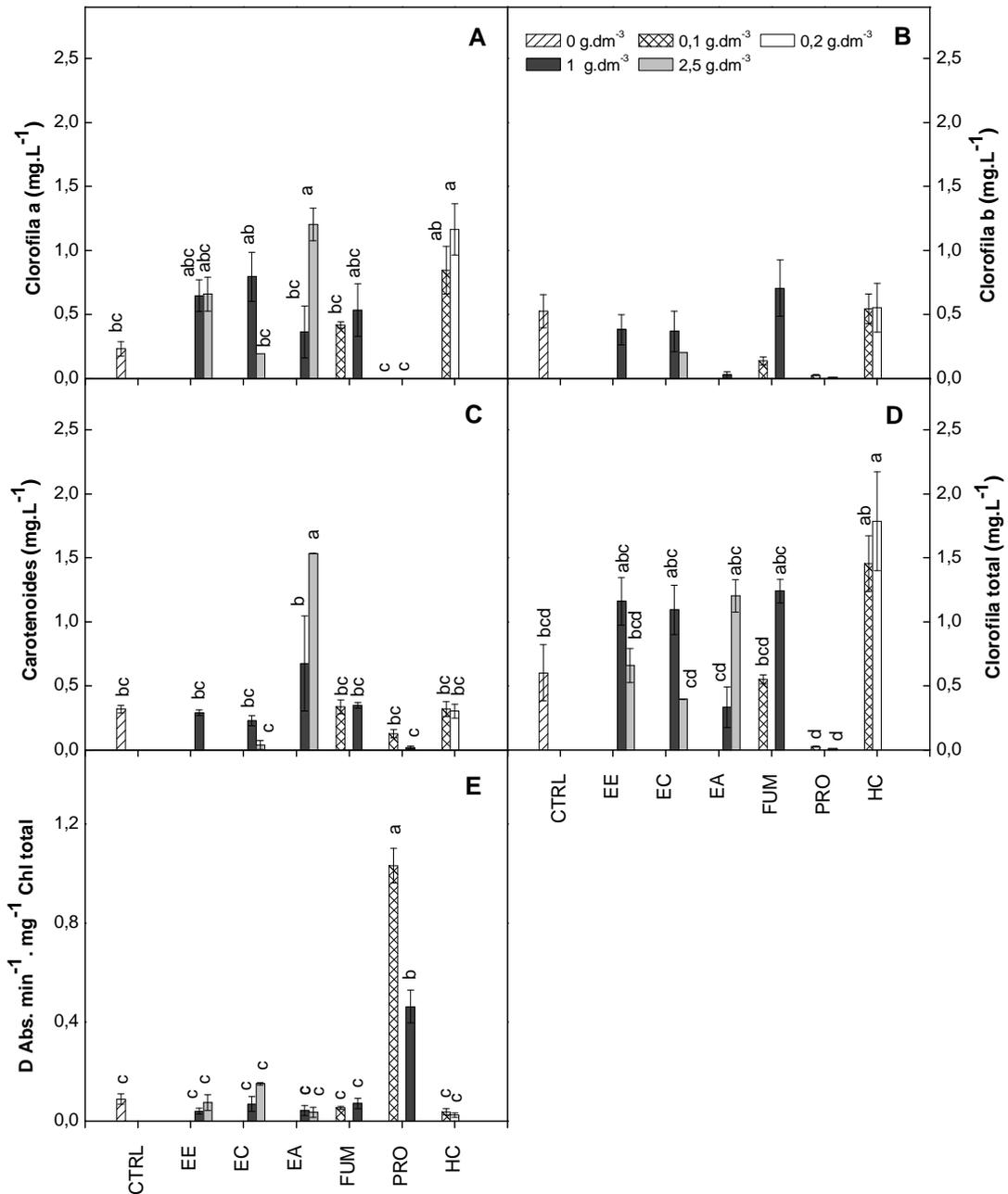


Figura 2. Valores médios da concentração de clorofila a (A), clorofila b (B), carotenoides (C), clorofila total (D) e atividade do fotossistema II, PSII (E) de plântulas de *Solanum lycopersicum* germinadas em diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* (EE: extrato etéreo, EC: extrato clorofórmico e EA: extrato acetônico) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³, e seus aleloquímicos isolados (ácido fumarprotocetrárico: FUM e ácido protocetrárico: PRO) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 18 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05), médias ± SE, n = 3.

Tabela 1. Análises dos extratos e dos aleloquímicos isolados (FUM- ácido fumarprotocetrárico; PRO – ácido proocetrárico; ATR – atranorina) de *Cladonia verticillaris* submetidos a análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Extratos	t _R * (min)	Compostos	Concentração (µg.mL ⁻¹)	FUM/ PRO (µg.mL ⁻¹)	FUM/ ATR (µg.mL ⁻¹)	PRO/ ATR (µg.mL ⁻¹)	FUM+PRO +ATR (µg.mL ⁻¹)	SNI** 1 (ca) t _R ≈ 8,5	SNI2 (ca) t _R ≈ 9,3	SNI 3 (ca) t _R ≈ 10,2
Etéreo	6,6±0,08	PRO	3,29							
	7,8±0,05	FUM	8,31	2,51	90,32	35,85	12,06	60,19	3,43	0,10
	27,8±0,07	ATR	0,09							
Clorofórmico	6,6±0,06	PRO	1,02							
	7,8±0,05	FUM	4,26	4,17	6,94	1,66	6,09	4,64	7,89	153,62
	27,8±0,04	ATR	0,61							
Acetônico	6,6±0,05	PRO	22,09							
	7,8±0,03	FUM	12,10	0,54	10,42	19,03	35,26	794,87	32,039	-
	27,8±0,08	ATR	1,16							

*T_R= tempo de retenção ** SNI= substância não identificada

Em *L. sativa*, apesar dos pigmentos fotossintéticos terem sido reduzidos pelos aleloquímicos, a atividade do PSII (Fig. 1E) apresentou aumento da atividade em resposta aos tratamentos com EE 2,5 g.dm⁻³ (614,28%) e EA 2,5 g.dm⁻³ (455,55%). Em *S. lycopersicum* o aumento da atividade do PSII ocorreu em resposta ao PRO 0,1 e 1,0 g.dm⁻³ (900 e 596,62% - Fig. 2E).

É interessante notar que o FUM induziu alterações apenas quando em concentração mais baixa (0,1 g.dm⁻³), inativando seus efeitos em concentrações maiores (Fig. 1).

3.2 Atividade Fotossintética (Pós-emergente)

Quando as sementes de *L. sativa* foram germinadas primeiramente em água e, depois transferidas para os diferentes tratamentos, observou-se que o FUM e nenhum extrato de *C. verticillaris* induziu alterações significativas no teor dos pigmentos fotossintéticos (Fig. 3A-D), mas o HC 0,1 g.dm⁻³ reduziu a concentração de Car em 60,46% (Fig. 3C). Contudo, a atividade do PSII foi estimulada pelo EE 1,0 g.dm⁻³ em até 411,11% (Fig. 3E).

Em *S. lycopersicum*, os três extratos testados na concentração de 1,0 g.dm⁻³ induziram aumento da concentração de Chl-a (Fig. 4A) de até seis vezes em relação ao controle ($p < 0.05$), sendo o maior efeito ocasionado pelo EC (456,52%). Este mesmo extrato e o EA 1,0 g.dm⁻³ ocasionaram aumento dos teores de Chl-total (Fig. 4D) em aproximadamente de até quatro vezes ($p < 0.05$). A atividade do PSII foi estimulada quando submetida ao EA na concentração de 2,5 g.dm⁻³ (106,66%) e apresentou um aumento de até dez vezes quando as plantas foram mantidas na presença de PRO (Fig 4E).

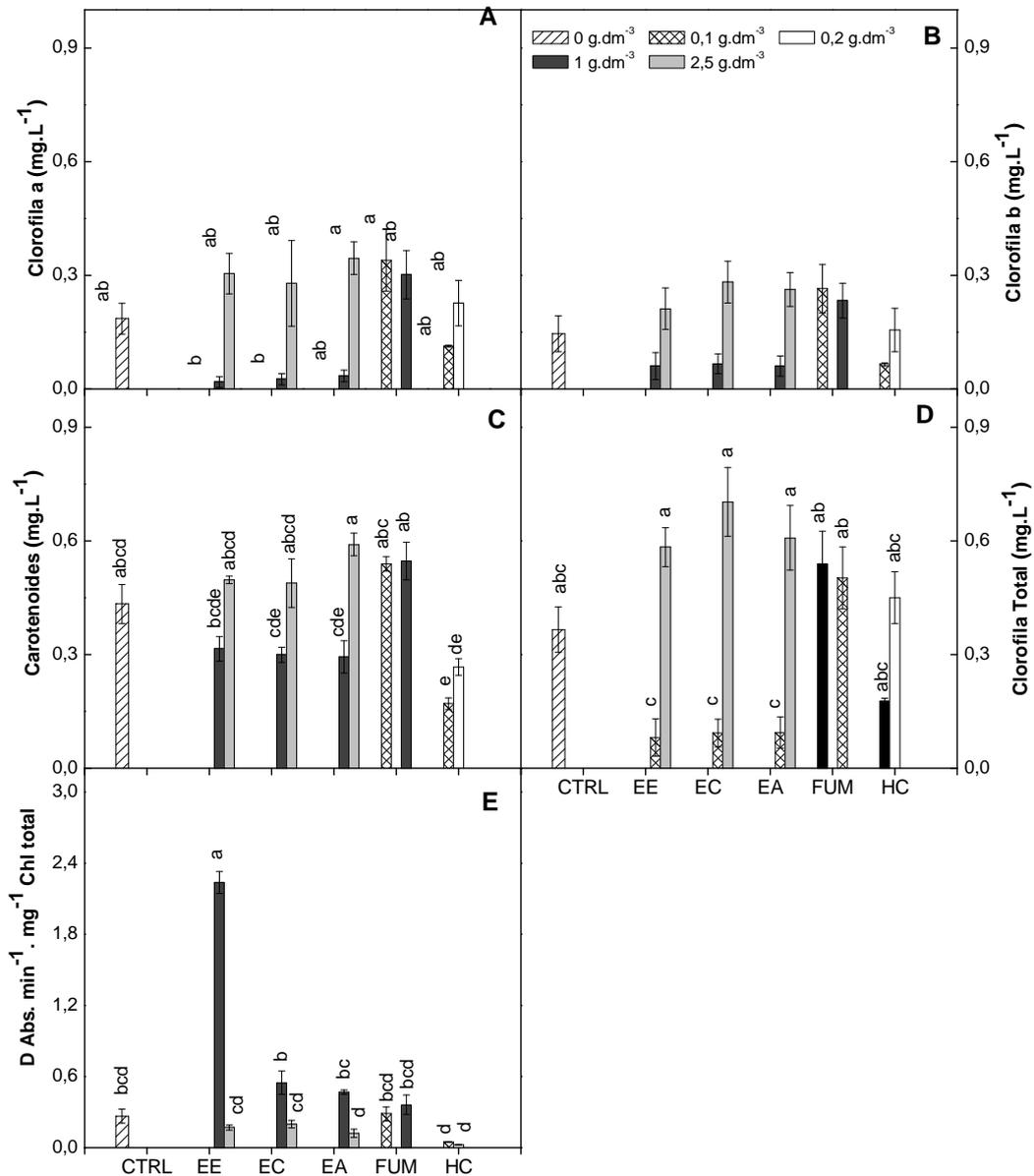


Figura 3. Valores médios da concentração de clorofila a (A), clorofila b (B), carotenoides (C), clorofila total (D) e atividade do fotossistema II, PSII (E) de plântulas de *Lactuca sativa* germinadas previamente em água e depois transferidas para os diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* (EE: extrato etéreo, EC: extrato clorofórmico e EA: extrato acetônico) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³ e seu aleloquímico ácido fumarprotocetrárico (FUM) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 15 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05), médias ± SE, n = 3.

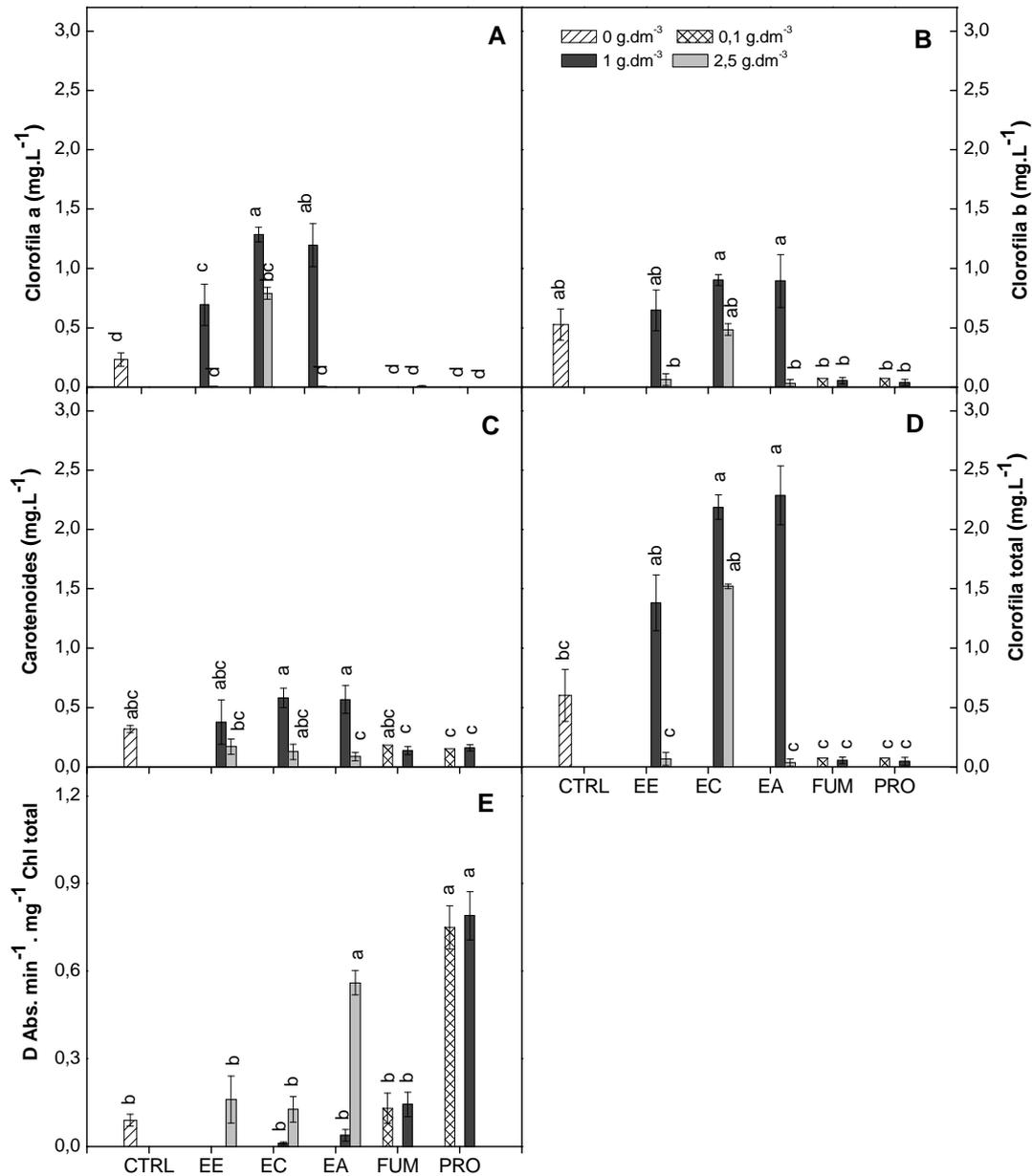


Figura 4. Valores médios da concentração de clorofila a (A), clorofila b (B), carotenoides (C), clorofila total (D) e atividade do fotossistema II, PSII (E) de plântulas de *Solanum lycopersicum* germinadas previamente em água e depois transferidas para os diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* (EE: extrato etéreo, EC: extrato clorofórmico e EA: extrato acetônico) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³ e seus aleloquímicos isolados (ácido fumarprotocetrárico: FUM e ácido protocetrárico: PRO) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, em duas concentrações, utilizando água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 21 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05), médias ± SE, n = 3.

3.3 Atividades enzimáticas

Assim como observado na atividade fotossintética de *L. sativa* e *S. lycopersicum* quando submetidas aos compostos fenólicos de *C. verticillaris* e ao HC, também foi possível registrar alterações nas atividades das enzimas oxidativas (PDO, PPO e CAT) das folhas das espécies-alvo, quando crescidas nas mesmas condições. Essas influências variaram em função do extrato e da concentração (Fig. 3 e Fig. 4).

Com exceção da CAT no bioensaio pós-emergente de *L. sativa*, todas as atividades enzimáticas em ambas as espécies-alvo, nos dois bioensaios, apresentaram interação extrato/concentração significativa (Fig. 5 e 6). Além disso, todas essas atividades, com exceção da POD no bioensaio pré-emergente com *L. sativa*, foram altamente estimuladas por pelo menos um tratamento.

No bioensaio pré-emergente com plântulas de *L. sativa*, observou-se que com exceção do EC 2,5 g.dm⁻³, todos os demais tratamentos inibiram a POD (Fig. 5A) em até 25 vezes em relação ao controle ($p < 0,05$), evidenciando que os aleloquímicos de *C. verticillaris* possuem ação similar ao HC nessa atividade. Diferentemente do observado na Fig. 5A com EC 2,5 g.dm⁻³, este extrato foi o único que induziu alterações na PPO (Fig. 5C) e CAT (Fig. 5E), levando a um aumento de até 1809,0 e 611,36%, respectivamente. Observou-se que nas plantas de *S. lycopersicum*, a POD foi estimulada quando as plântulas foram incubadas com EE 1,0 g.dm⁻³ (437,97%), FUM 0,1 g.dm⁻³ (687,09 %) ou HC 0,2 g.dm⁻³ (841,93%), a PPO principalmente quando submetida ao EE 1,0 g.dm⁻³ (651,85%) e FUM 0,1 g.dm⁻³ (1100%), ou HC 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ (1200 e 1150%), e a CAT sobretudo quando submetida ao FUM 0,1 g.dm⁻³ (459,09%) ou em EA 2,5 g.dm⁻³ (390,9%).

No bioensaio pós-emergente, os três extratos testados induziram o aumento da atividade da POD, sendo o EE 1,0 g.dm⁻³ o indutor dos maiores estímulos em *L. sativa* (520%) e *S. lycopersicum* (2003,22%). A PPO de *S. lycopersicum* foi fortemente estimulada por todos os tratamentos (Fig. 6D), sendo o maior efeito induzido por EE 1,0 g.dm⁻³ (820%), que sobretudo também aumentou a atividade da PPO de *L. sativa* em 637,5%. A CAT foi estimulada pelo EE, EA e HC, sendo o maior efeito ocasionado pelo EA 2,5 g.dm⁻³ (359,09%).

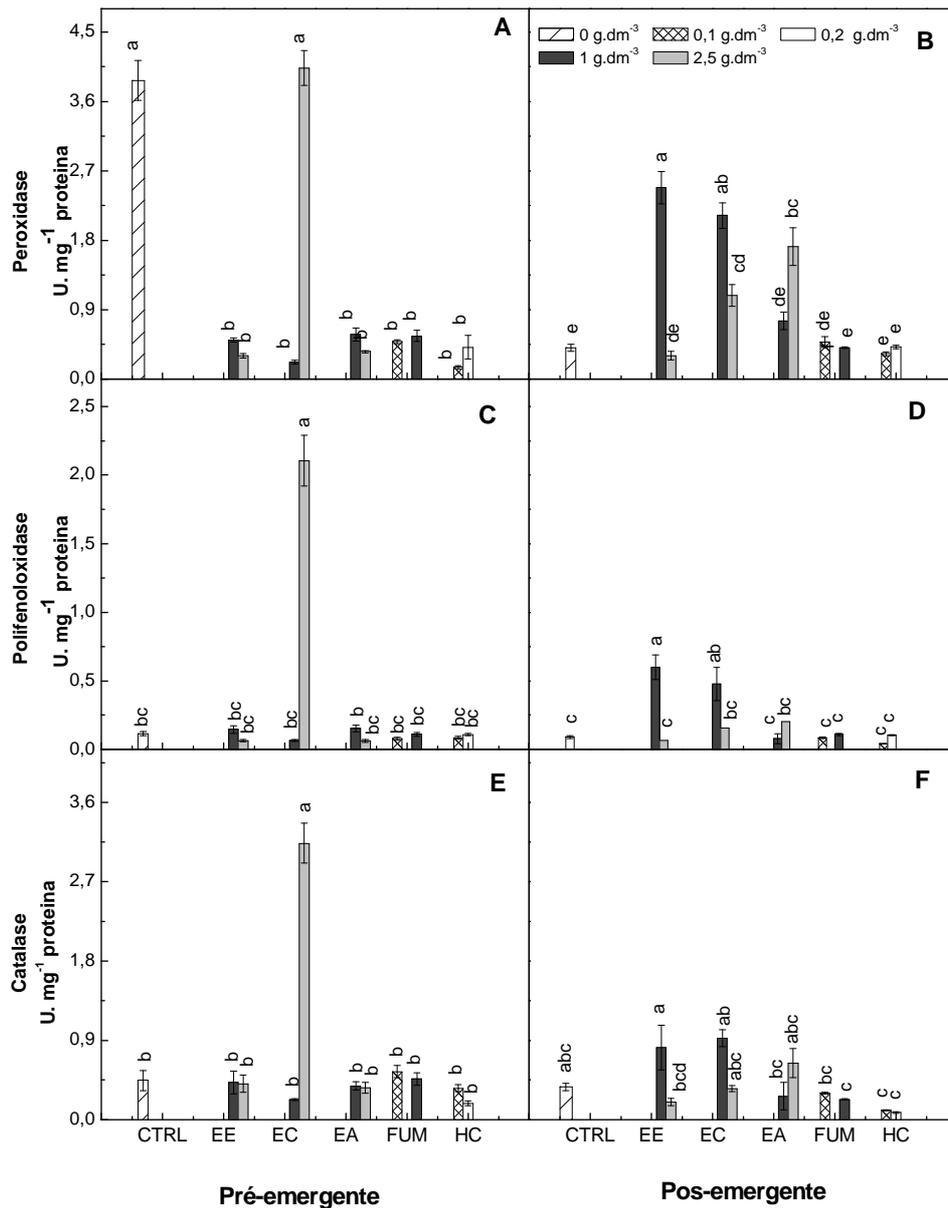


Figura 5. Valores médios da atividade da peroxidase (A,B), polifenoloxidase (C,D) e catalase (D,E) de folhas de plântulas de *Lactuca sativa* germinadas (A, C e E) ou transferidas após germinadas em água (B, D e F) para os diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* (EE: extrato etéreo, EC: extrato clorofórmico e EA: extrato acetônico) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³ e seu aleloquímico ácido fumarprotocetrárico (FUM) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas das figuras A, C e E foram avaliadas 12 dias após a germinação e as B, D e F 15 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05), médias ± SE, n = 3.

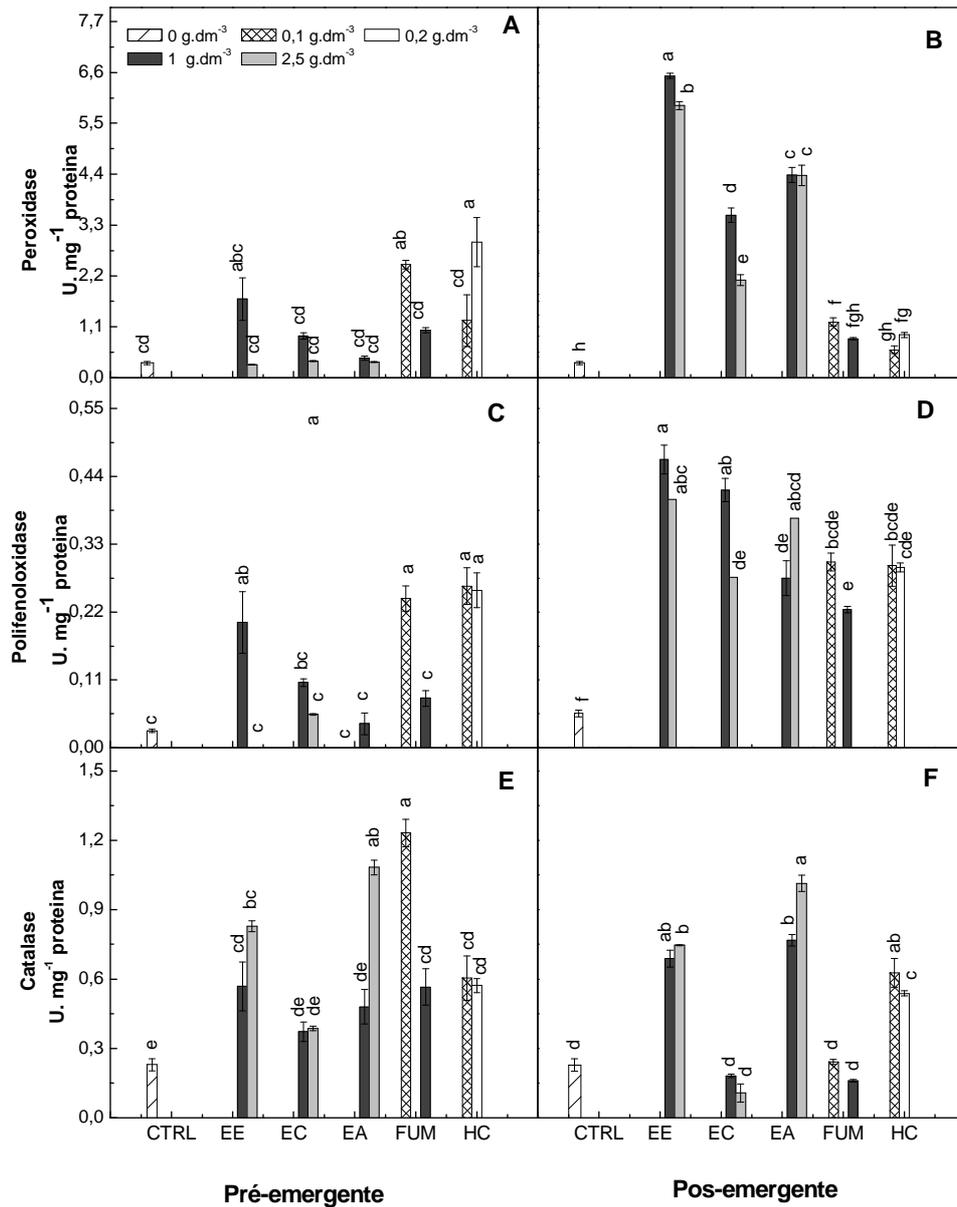


Figura 6. Valores médios da atividade da peroxidase (A,B), polifenoloxidase (C,D) e catalase (D,E) de folhas de plântulas de *Solanum lycopersicum* germinadas (A, C e E) ou transferidas após germinadas em água (B, D e F) para os diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* (EE: extrato etéreo, EC: extrato clorofórmico e EA: extrato acetônico) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³ e seu aleloquímico ácido fumarprotocetrárico (FUM) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas das figuras A, C e E foram avaliadas 18 dias após a germinação e as B, D e F 21 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05), médias ± SE, n = 3.

Com exceção da POD no bioensaio pré-emergente, todas as alterações significativas da POD, PPO e CAT em respostas aos aleloquímicos, nos dois bioensaios, apresentaram respostas similares ao HC.

Uma vez utilizado o FUM como controle positivo nas análises, pode-se inferir que as respostas obtidas frente aos extratos de *C. verticillaris* não são ocasionadas pelo FUM (Fig. 5) ou unicamente por ele (Fig. 6B), mas pela interação sinérgica com as substâncias identificadas e/ou com as substâncias não identificadas, SNI (Tab.1), visto que as ações observadas pelos extratos muitas vezes são superiores ao FUM (Fig. 6B). Todavia a inferência é que o FUM pode ser o agente indutor das respostas obtidas, agindo de forma espécie/específica e multidirecional (Fig. 5 e 6), ou seja, cada aleloquímico presente no extrato age em um sítio diferente, dependendo da espécie e das condições do experimento, podendo agir com sinérgico (Fig. 6B), antagonismo (Fig. 6E) ou mesmo pela ação especificidade do aleloquímico (fig. 6C). Na figura 6 quando se comparam os dois bioensaios, nota-se que o FUM é muito mais ativo no bioensaio pré-emergente, e os extratos muito mais eficazes em suas ações de promoverem danos oxidativos no estágio pós-emergente.

3.4 Detecção da morte celular e peroxidação em células de *L. sativa*

A morte celular foi evidenciada por meio do corante azul de Evans e observou-se que as células intactas permaneceram transparentes e as células mortas apresentaram coloração azul (Fig.7E) ou marrom escuro (Fig. 7 e 8). Foi possível observar nítidas lesões necróticas nos tecidos radiculares (Fig. 7F-H) e foliares (Fig. 8G-H) causado pelo EA 2,5 g.dm⁻³. As pigmentações observadas podem ser acúmulo de substâncias fenólicas. As cloroses evidenciadas pelo EE 2,5 g.dm⁻³ resultam da perda de clorofila como consta na Figura 8C, 1A-B e 1D. Observou-se a formação de raízes laterais nas plântulas incubadas com EE e EA 2,5 g.dm⁻³ (7C e 7F), uma formação de uma extensão radicular na zona apical (Fig. 7G) e um aumento da espessura no ápice radicular, de forma globosa quando crescidas com EA 2,5 g.dm⁻³ (Fig. 7I).

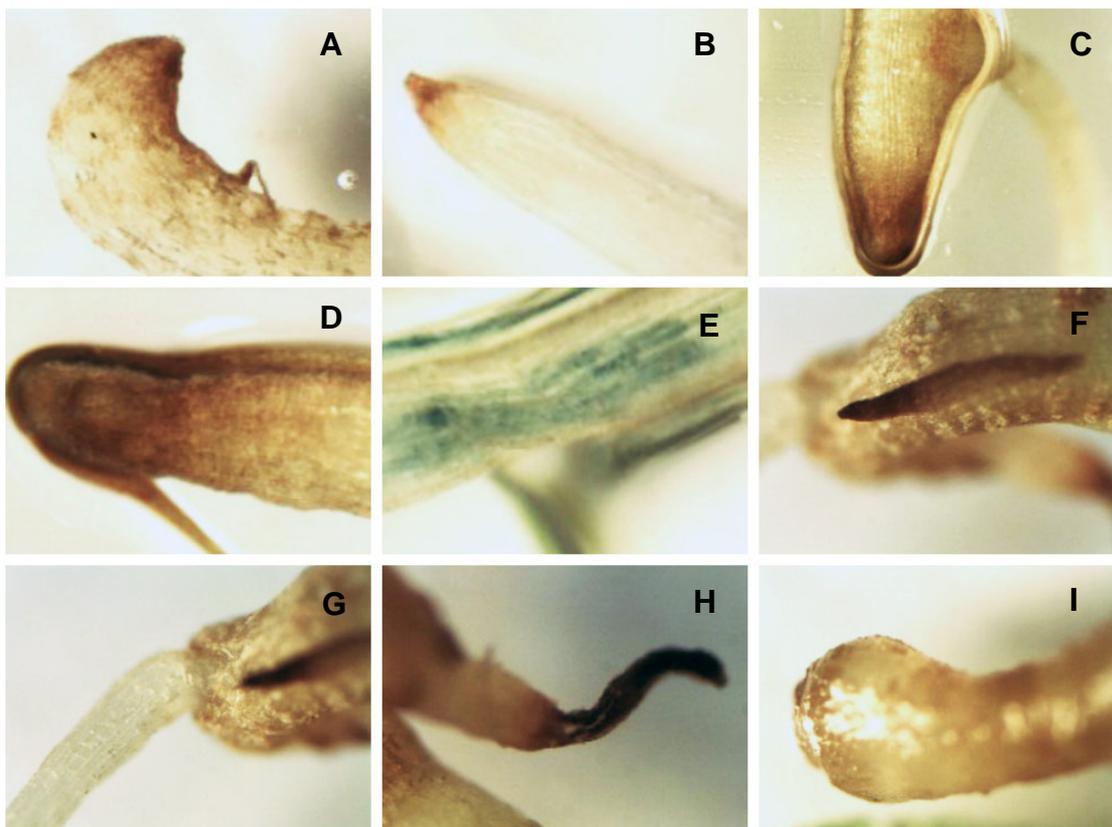


Figura 7. Radículas de plântulas de *Lactuca sativa* após dez dias de germinação em diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* ($2,5 \text{ g.dm}^{-3}$) e posteriormente tratadas com azul de Evans para detecção de morte celular. **A e B:** controle; **C e D:** radículas de plântulas crescidas em extrato etéreo; **E:** radículas de plântulas crescidas em extrato clorofórmico; **F-I:** radículas de plântulas crescidas em extrato acetônico.

3.5 Quantificação dos aleloquímicos de *C. verticillaris*

Foi possível observar através dos cromatogramas a presença dos compostos majoritários de *C. verticillaris*. A concentração total desses compostos, FUM+PRO+ATR apresentou-se da seguinte forma: $EC < EE < EA$ (Tab 1), podendo-se hipotetizar que essa seja a resposta para os efeitos tão distintos causados pelo EA, produzindo plântulas anormais (Fig. 7G-I e 8F-I), ou ainda que estas severas alterações estejam relacionadas às duas substâncias não identificadas, SNI 1 e SNI 2 (Tab.1), que apresentaram-se em teores significativos nos cromatogramas.

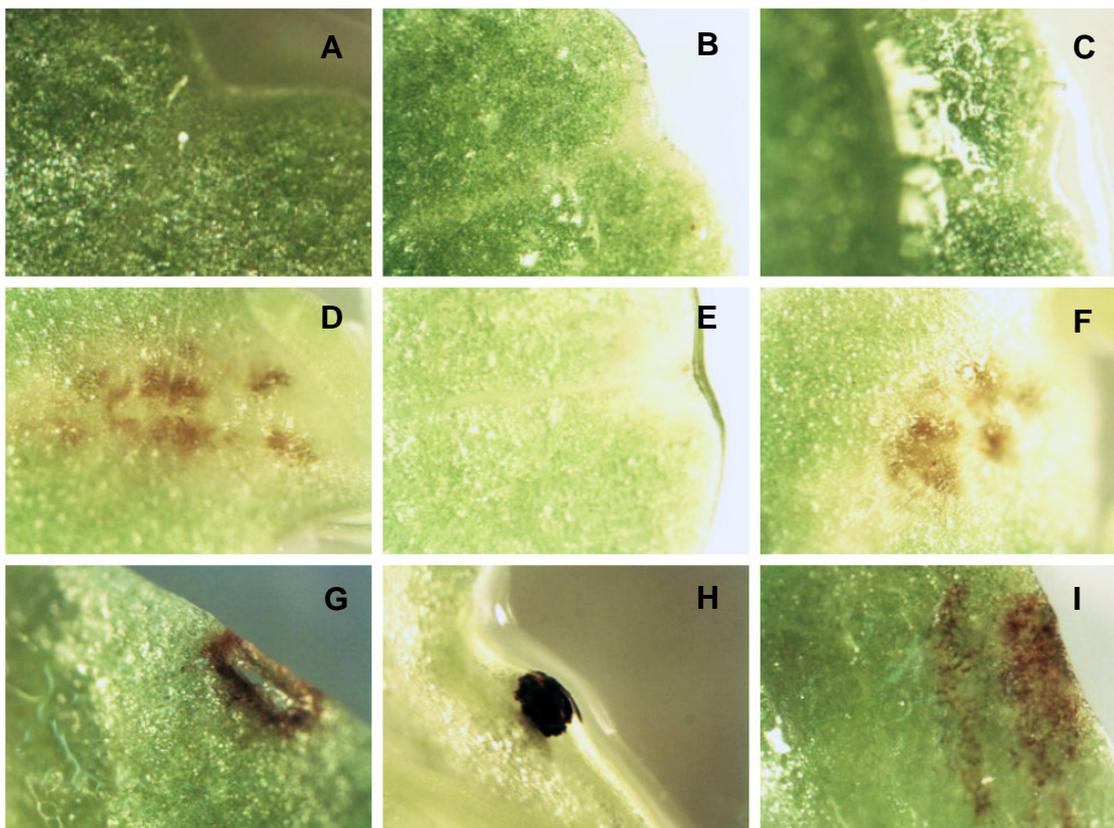


Figura 8. Folhas de plântulas de *Lactuca sativa* após dez dias de germinação em diferentes extratos de *Cladonia verticillaris* e posteriormente tratadas com azul de Evans para detecção de morte celular. **A:** controle; **B e C:** folhas de plântulas crescidas em extrato etéreo ($2,5 \text{ g.dm}^{-3}$); **D:** folhas de plântulas crescidas em extrato clorofórmico ($2,5 \text{ g.dm}^{-3}$); **E:** folhas de plântulas crescidas em extrato clorofórmico ($1,0 \text{ g.dm}^{-3}$); **F-G e I:** folhas de plântulas crescidas em extrato acetônico ($2,5 \text{ g.dm}^{-3}$); **H:** pecíolo de plântulas crescidas em extrato acetônico ($2,5 \text{ g.dm}^{-3}$).

Nessas análises verificou-se que o EE possui uma forte relação FUM/ATR e PRO/ATR, gerando resultados diferenciados dos demais extratos, como observado na Figura 1E e 2E. Uma vez que o PRO presente nos bioensaios, não apresentou influências sobre as plântulas, é possível inferir que a interação FUM/ATR pode ser a indutora das alterações observadas no PSII de *L. sativa*.

Apesar do EC apresentar baixas concentrações aleloquímicas, os resultados obtidos por esse extrato nas atividades das enzimas oxidativas foram altamente

significativos (Fig. 5 e 6). Uma vez que os resultados obtidos com FUM nesses sítios-alvo foram gerados em baixa concentração ($0,1 \text{ g.dm}^{-3}$), é possível que este aleloquímico seja o indutor das respostas obtidas, ou ainda que este esteja interagindo com uma terceira SNI, uma vez que ela apresenta-se em alto teor nos cromatogramas e não está presente no EA, além de ser pouco expressiva no EE.

DISCUSSÃO

A elucidação dos mecanismos de ação e o modo como os aleloquímicos agem no crescimento e desenvolvimento das plantas tem sido desafiador para muitos pesquisadores, pois os aleloquímicos interferem em muitos processos metabólicos. De uma maneira geral, a ação dos aleloquímicos se resume na interferência nas atividades vitais das plantas, ou seja, na fotossíntese, respiração, assimilação de nutrientes, síntese de proteínas, atividades enzimáticas e na permeabilidade da membrana plasmática (Almeida, 1998; Resende e Pinto, 2003).

Em todos os bioensaios aqui estudados observou-se que os efeitos de aleloquímicos nas plantas receptoras foram altamente dependentes da dose, e que *S. lycopersicum* foi mais resistente aos aleloquímicos do que *L. sativa*, demonstrando que os aleloquímicos podem ser seletivos em suas ações e as plantas podem ser seletivas em suas respostas, motivo pelo qual torna-se difícil esclarecer o modo de ação destes compostos (Seigler, 1996).

Em estudos anteriores sobre o efeito alelopático de *C. verticillaris*, Tigre *et al.* (2012) observaram que os compostos fenólicos dessa espécie induzem modificações na área foliar de plântulas de *L. sativa*, podendo estas inibições serem reflexos da diminuição da concentração de clorofila observadas no presente estudo (1A-D). Estas reduções do teor de clorofila são relacionadas como um dos sintomas da interferência dos aleloquímicos sobre as plantas (Singh *et al.*, 2002). A diminuição da concentração de clorofila também foi observada com ácidos fenólicos em arroz (Yang *et al.*, 2002.), ácido secalônico em sorgo (Zeng *et al.*, 2001) e monoterpenos em *Cassia occidentalis* (Singh *et al.*, 2002). Silva (2009) também observou diminuição na produção de clorofila em alface e cebola quando tratadas com extrato etanólico e todas as frações da parte

aérea e parte subterrânea de *Hydrocotyle bonariensis*. Ácidos ferúlico, p-cumárico, benzoicos e cafeico também reduziram a quantidade de clorofilas de soja (Baziramakenga *et al.*, 1994). Ácidos evérnico, úsnico e atranorina atuam como ativadores de clorofilases (Bouaid e Vicente, 1998).

Uma vez que PRO apresentou resultados redutores da concentração dos pigmentos fotossintéticos em *L. sativa* (Fig. 1A-D), é possível que os resultados obtidos com EA e EE estejam relacionados à grande concentração de PRO nesses extratos (Tab. 1), e que o aumento da atividade do PSII ocasionados pelo EE e o EA (Fig. 1E) não seja relacionado ao FUM e PRO, podendo ser a ação dos extratos muito mais de natureza sinérgica do que uma ação exclusiva destas substâncias. A distinção nos resultados obtidos com *S. lycopersicum* pode ser decorrente da especificidade aleloquímica (Alford *et al.*, 2009).

Ainda não está claro o mecanismo pelo qual ocorre a redução da clorofila quando as plântulas são tratadas com aleloquímicos podendo haver dois fatores para essa causa: degradação da clorofila ou inibição da sua síntese Mg-porfirina. A única confirmação obtida nestes estudos, é o fato da redução no teor de clorofila afetar drasticamente as taxas fotossintéticas, comprometendo o desenvolvimento das plantas (Yu *et al.*, 2003). Todavia, isto não foi observado neste trabalho, pois apesar da diminuição do teor de clorofilas, a atividade do PSII foi estimulada em *L. sativa* (Fig. 1E), diferentemente das respostas obtidas no bioensaio pós-emergente, que não apresentou diferenças significativas na concentração de clorofilas, mas aumentou a atividade do PSII (Fig. 3). Este mesmo resultado foi reproduzido para as plântulas de *S. lycopersicum* no bioensaio pré-emergente (Fig. 2), pois as alterações observadas nos pigmentos fotossintéticos foram diferentes dos extratos que induziram o aumento do PSII, porém o aumento no teor de clorofila, mostrada na Figura 4D, refletiu-se no PSII (Fig. 4E). Este alto estímulo pode ser ocasionado pelas baixas concentrações dos aleloquímicos, que mesmo em baixos níveis, a interação entre as substâncias apresenta-se elevada (Tab.1), podendo ser que o aumento da atividade do PSII ocasionado pelo EE 1,0 g.dm⁻³ (Fig. 3E) seja resultado da ação sinérgica, principalmente na relação FUM/ATR. Séries de análogos de ácidos rododadônico também causaram um aumento na atividade de PSII de *L. sativa* e *Amaranthus viridus* em relação aos controles (Romagni *et al.*, 2004).

Em *S. lycopersicum*, com exceção da Chl-b, todos os parâmetros fotossintéticos analisados foram estimulados, inclusive o herbicida apresentou ação estimulante ou inibidora da degradação da síntese dos pigmentos, evidenciando que nesta espécie, os aleloquímicos apresentam efeitos análogos ao HC (Fig. 2). É possível que tanto os extratos como o HC, que possuem ação similar, estejam causando estresse em *S. lycopersicum* gerando o aumento da atividade do PSII, como estratégia de sobrevivência. Este aumento pode estar correlacionado com o aumento da atividade das enzimas responsáveis pela defesa contra estresse oxidativo (Fig. 5 e 6). Células fotossintéticas são propensas ao estresse oxidativo, pois elas contêm uma série de pigmentos fotossensibilizantes que produzem e consomem oxigênio, sendo o sistema de transporte de elétron fotossintético a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs) em tecidos vegetais (Asada, 1997). Todos os organismos produzem uma série de EROs durante o decorrer dos processos metabólicos normais (Kotchoni *et al.*, 2006). Essas EROs são conhecidas por atuarem como moléculas sinalizadoras, que regulam a resposta da planta aos estresses bióticos e abióticos (Foyer e Noctor, 2005), emergindo como importantes reguladores do desenvolvimento vegetal (Gapper e Dolan, 2006). Para evitar o dano celular, devido à geração de EROs, as plantas produzem uma série de enzimas antioxidantes que são induzidas e fornecem proteção secundária contra o estresse oxidativo (Mittler *et al.*, 2004).

Há relatos de que os ácidos fenólicos podem bloquear a função de muitas enzimas, se forem suficientemente concentradas no local de funções enzimáticas (Prasad e Devi, 2001). No bioensaio pré-emergente com plântulas de *L. sativa* crescidas com aleloquímicos de *C. verticillaris* observou-se que, com exceção do EC 2,5 g.dm⁻³, todos os tratamentos reduziram a atividade da POD (Fig. 5A), sendo este o único parâmetro onde o HC diferiu do CTRL, tendo os aleloquímicos ação similar a esse herbicida (p<0,05). Diferentemente do observado na POD, o EC 2,5 g.dm⁻³ foi o único tratamento que estimulou a atividade da PPO e CAT (5C e 5E). Vale ressaltar que as POD, muito comum na parede celular, também são encontradas nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e no citosol (Cakmak *et al.*, 1993), podendo essa diminuição estar relacionada com a redução dos pigmentos fotossintéticos e com o elevado nível de estresse causado por essa ação. Apesar da PPO estar localizada principalmente no lúmen dos tilacóides e nas membranas dos cloroplastos (Tomás Barberan e Robins, 2007), sua atividade foi estimulada, podendo ser uma

estratégia utilizada por essas estruturas para tentar manter o equilíbrio do sistema antioxidante. Agrios (1997) afirma que, quanto maior a atividade da enzima PPO, maiores concentrações de produtos tóxicos da oxidação serão obtidos.

A CAT é especialmente importante na remoção do H₂O₂ gerado nos peroxissomos (Gill e Tuteja, 2010), principalmente durante situações de estresse onde há o aumento de EROs e proliferação dos peroxissomos na célula (Lopez-Huertas *et al.*, 2000). Nestas situações, uma população densa de peroxissomos torna-se importante para a detoxificação do H₂O₂, uma vez que EROs podem difundir livremente do citosol para dentro destas organelas, de forma que esta enzima torna-se importante não somente na detoxificação do peróxido produzido nos peroxissomos, mas também durante o aumento global desta molécula dentro da célula em situações de estresse (Mittler, 2002). Logo, POD e CAT desempenham um papel importante na regulação da concentração de EROs na célula através da eliminação de H₂O₂ (Ushimaru *et al.*, 2001). Cruz-Ortega *et al.* (2002) estudando os extratos de *Callicarpa accuminata* sobre *S. lycopersicum*, constataram que o nível de CAT e de danos das membranas radiculares foram aumentados e Politycka *et al.* (2004) relataram que a exposição das raízes de *Cucumis sativus* ao ferúlico e ao ácido p-cumárico aumentava o nível de POD.

Um modelo de ação relacionado ao dano oxidativo foi proposto para 2(3H)-benzo-oxazolinoni (BOA) no metabolismo de plantas (Batish *et al.*, 2006). Estes estudos concluíram que BOA induz a geração de estresse oxidativo com altos níveis de peroxidação lipídica e concomitante danos às células. Oracz *et al.* (2007) observaram que extrato de girassol induz estresse oxidativo com o aumento da concentração de H₂O₂ na germinação de sementes de mostarda. Baziramakenga *et al.* (1995) descobriram que os ácidos benzóico e cinâmico danificaram a integridade da membrana celular por uma diminuição nos grupos sulfidríla, onde ambos os compostos induziram a peroxidação lipídica que resultou na formação de radicais livres em membranas e na inibição das atividades de CAT e POD. Lara-Nunez *et al.* (2009), constataram que o lixiviado aquoso de *Sicyos deppei* causava dano oxidativo em *S. lycopersicum*. Claramente, este estresse aleloquímico produz um desequilíbrio como evidenciado pela geração de EROs e pela alteração da atividade de enzimas antioxidantes.

Portanto, o aumento das atividades antioxidantes (Fig. 5 e 6) seria uma detoxificação de EROs que repercutiria em níveis mais elevados da atividade fotossintética (Fig. 1E, 2E, 3E e 4E). Na Figura 5B e 5D, observa-se que POD e PPO atuam na mesma direção como relatado por Kar e Mishra (1975), porém segundo esses autores é esperado uma redução da CAT quando essas diminuem e vice-versa, contudo a CAT não foi alterada (Fig. 5F). Este fato deve-se provavelmente ao seu elevado *turnover* (k_{cat}), o que demonstra a importância dessa enzima para a desintoxicação de H_2O_2 (Nelson *et al.*, 2005).

Molnár e Farkas (2010) afirmam que os compostos liquênicos possuem uma forte atividade antioxidante e Hidalgo *et al.* (1994) atribuem esta atividade à ATR, presente no EE, EC e EA. Altos níveis de atividades de enzimas antioxidantes foram encontrados em resposta ao estresse abiótico, podendo desempenhar um papel importante no mecanismo de aquisição de tolerância das plantas a diferentes situações de estresses ambientais (Mazorra *et al.*, 2002). O aumento da atividade enzimática em situações de estresse pode ser resultado de uma alteração metabólica que conduz a um processo adaptativo (Vuleta e Šešlija, 2007).

Os fenóis liquênicos têm sido descritos como poderosos antioxidantes (Kranner e Birtić, 2005), agindo como agentes desintoxicadores de EROs (Pavithra *et al.*, 2013). Um dos diversos efeitos dos aleloquímicos nas plantas é o controle da produção e acumulação de EROs, que ocorre nas células em resposta ao aleloquímico, sendo desta forma responsáveis por danificar as células causando peroxidação lipídica, dano oxidativo a proteínas e DNA e, finalmente, a morte celular (Aliotta *et al.*, 2004), ou o aparecimento de lesões necróticas (Foyer e Noctor 2005). Resultados assim de danos visíveis, como lesões necróticas (Fig. 7F-H, 8G-H) e morte celular (7E) foram registrados nos tecidos radiculares e foliares de *L. sativa* decorrente da incubação com aleloquímicos. Manchas de coloração marrom também foram registradas nesses tecidos que podem indicar acúmulo de fenóis, peroxidação lipídica ou acúmulo de H_2O_2 , que indica o estresse oxidativo, podendo ser um sinalizador da morte celular (Fig. 8). Assim, a geração de EROs, parece ser o fator primário que causa a inibição do crescimento, evidenciado ser uma causa, ao invés de um resultado de lesão celular. Ácido úsnico (-) inibiu a biossíntese de clorofilas e carotenoides, agindo sobre a enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase, induzindo a morte das plantas de *L. sativa*

(Romagni *et al.*, 2000). Bais *et al.* (2003) relataram que (-)-catequina inibe o crescimento de plantas, devido a um metabolismo oxidativo grave nas extremidades das raízes, o que resulta na morte celular. Portanto, alguns produtos naturais com maior atividade fitotóxica podem induzir severa alteração no crescimento das plantas, devido à indução de morte celular programada (Keller *et al.*, 2008) e restrição na divisão celular (Teerarak *et al.*, 2012).

Além disso, deve ser salientado, que o modo de ação dessas substâncias é multidirecional, podendo também ter ação distinta em cada órgão da planta (Fig. 7 e 8). Em bioensaios desta natureza, percebe-se que, comparada à parte aérea das plântulas, a absorção e, conseqüentemente, a concentração de fitotoxinas ou fitorreguladores nos tecidos radiculares é favorecida, devido ao contato físico da radícula com o papel-filtro, o que a expõe diretamente ao extrato. A capacidade de translocação do aleloquímico da radícula para a parte aérea, e o seu mecanismo de ação também devem ser considerados. Desta forma, a bioatividade de extratos estaria condicionada à capacidade de absorção, translocação e mecanismo de ação dos seus compostos potencialmente alelopáticos (Correia *et al.*, 2005).

De maneira geral, as plântulas de *L. sativa* apresentaram sintomas de toxicidade quando submetidas aos aleloquímicos e ao HC, sendo estes efeitos mais significativos mediante aos aleloquímicos. Morfologicamente essas plântulas apresentavam-se anormais com necroses no ápice radicular, raízes espessas, hipocótilo enrolado, tamanho reduzido e algumas mortas. Tanto *C. verticillaris* quanto o HC reduziram os pigmentos fotossintéticos (Fig. 1A-D) e a atividade da POD (Fig. 5A), porém o HC não interferiu no PSII (Fig. 1E e Fig. 3E), na PPO (Fig. 5C-D) e CAT (Fig. 5E), sendo observado o aumento dessas atividades apenas quando submetidos aos extratos. Em *S. lycopersicum* todos os parâmetros analisados foram induzidos ao aumento das suas atividades que variaram em função do tratamento/concentração. Diferente das respostas obtidas em *L. sativa*, as plântulas de *S. lycopersicum* submetidas ao HC apresentavam-se mais vigorosas e com maior área foliar e os extratos induziram a sintomas de toxicidade, porém com plântulas normais. O HC não interferiu na atividade do PSII de *S. lycopersicum* e quando comparado suas ações com os aleloquímicos nos demais parâmetros, esses apresentavam resultados mais expressivos.

Diante desses resultados, pode-se inferir que o dano oxidativo observado não é o único responsável pelo efeito fitotóxico no desenvolvimento de *S. lycopersicum* e *L. sativa*. Em outras palavras, pode-se concluir que o seu efeito inibidor/estimulador representa a soma de muitos processos metabólicos afetados em momentos diferentes. Visto que o HC e os extratos não apresentaram ações significativas com características herbicidas, porém de estímulo, é possível que esses aleloquímicos possam ser estudados para prospecção de fitoreguladores. E, visto que os extratos de *C. verticillaris* aumentaram a concentração de EROs em *L. sativa* e *S. lycopersicum*, como ocorre comumente nas respostas das plantas aos herbicidas, é possível que os aleloquímicos dessa espécie líquênica possam ser usados no controle de plantas daninhas de forma espécie-específica.

AGRADECIMENTOS

R. C. Tigre e E. C. Pereira são gratas à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES, Brasil), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelos apoios e as bolsas de estudo concedidos. Este trabalho foi financiado por uma doação do Ministério da Ciência e Inovação (Espanha), BFU2009-11983 para C. Vincent M. e E. Legaz.

REFERÊNCIAS

- Agrios, G.N. 1997. **Plant pathology**. San Diego. Academic Press. 635p.
- Alford, É.R.; Vivanco, J.M.; Paschke, M.W. 2009. The effects of flavonoid allelochemicals from knapweeds on legume-rhizobia candidates for restoration. **Restoration Ecology** 17:506-514.
- Almeida, F.S. 1988. **A alelopatia em plantas**. Londrina, IAPAR, Circular. 55, 62p.
- Aliotta, G.; Ligrone, R.; Cinglia, C.; Pollio, A.; Stanzione, M.; Pinto, G. 2004. Application of microscopic techniques to the study of seeds and microalgae

- under olive oil wastewater stress. Pp. 289-314. *In*: Francisco A. Macías; Juan C. G. Galindo; José M. G. Molinillo; Horace G. Cutler. (Eds.). **Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals**. CRC Press.
- Asada, K. 1997. The role of ascorbate peroxidase and monodehydrascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. Pp. 715 -735. *In*: Scandolios, J. G. (Ed.). **Oxidative stress and the molecular biology of antioxidante defenses**. Cold Spring Harbor Laboratory Press Plainview.
- Bais, HP; Vepachedu, R.; Gilroy, S.; Callaway, RM.; Vivanco, JM. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. **Science 30**: 1377-1380.
- Baziramakenga, R.; Simard, R.R.; Leroux, G.D. 1994. Effects of benzoic and cinnamic acids on growth, mineral composition and chlorophyll content of soybean. **Journal of Chemical Ecology 20**: 2821-2833.
- Baziramakenga, R.; Leroux, G.D.; Simard, R.R. 1995. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. **Journal of Chemical Ecology 21**: 1271-1285.
- Batish, D.R.; Singh, H.P.; Setia, N.; Kaur, S.; Kohli, R.K. 2006. 2-Benzoxazolinone (BOA) induced oxidative stress, lipid peroxidation and changes in some antioxidant enzyme activities in mung bean (*Phaseolus aureus*). **Plant Physiology and Biochemistry 44**: 819–827.
- Bouaid, K.; Vicente, C. 1998. Chlorophyll degradation effected by lichen substances. **Annales Botanici Fennici 35**: 71-74.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília. 399p.
- Cakmak, I.; Strbac, D.; Marschner, H. 1993. Activities of hydrogen peroxide scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal of Experimental Botany 44**: 127-132.

- Correia, N.M.; Centurion, M.A.P.C.; Alves, P.L.C.A. 2005. Influência de extratos aquosos sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de soja. **Ciência Rural** **35** (3): 498-503.
- Cruz-Ortega, R.; Ayala-Cordero, G.; Anaya, AL. 2002. Allelochemical stress produced by the aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: effects on roots of bean, maize, and tomato. **Physiologia Plantarum** **116**: 20-27.
- Dayan, F.E.; Cantrell, C.L.; Duke, S.O. 2009. Natural products in crop protection. **Bioorganic e Medicinal Chemistry** **17**: 4022–4034.
- Devi, S.R.; Prasad, M.N.V. 1996. Ferulic acid mediates changes in oxidative enzymes of maize seedlings: Implications in growth. **Biologia Plantarum** **38**: 387-395.
- Foyer, C.H; Noctor, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell** **17**: 1866–187.
- Gapper, C.; Dolan, L. 2006. Control of plant development by reactive oxygen species. **Plant Physiology** **141**: 341-5.
- Gill, S.S.; Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry** **48**: 909-930.
- Gniazdowska, A.; Bogatek, R. 2005. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. **Acta Physiologia Plantarum** **27** (3): 395-407.
- Hidalgo, M. E.; Fernández, E.; Quilhot, W.; Lissi E. 1994. Antioxidant activity of depsides and depsidones. **Phytochemistry** **37**: 1585-1587.
- Inderjit; Duke, S.O. 2003. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta** **217**: 529-539.
- Kar, M.; Mishra, D. 1975. Inorganic pyrophosphatase activity during rice leaf senescence. **Canadian Journal of Botany** **53**: 503-510.

- Kar, M., Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during leaf senescence. **Plant Physiology** **57**: 315-319.
- Keller, C.P.; Barkosky, R.R.; Seil, J.E.; Mazurek, S.A.; Grundstad, M.L. 2008. The electrical response of *Phaseolus vulgaris* roots to abrupt exposure to hydroquinone. **Plant Signaling & Behavior** **3**: 633–640.
- Kotchoni, O.S.; Kuhns, C.; Ditzer, A.; Kirch, H.H.; Bartels, D. 2006. Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. **Plant, Cell & Environmental** **29**: 1033–1048.
- Kranner, I.; Birtić, S. 2005. A modulating role for antioxidant in desiccation tolerance. **Integrative and Comparative Biology** **45**: 734-740.
- Lara-Nunez, A.; Sanchez-Nieto, S.; Anaya, A.L.; Cruz-Ortega, R. 2009. Phytotoxic effects of *Sicyos deppei* (Cucurbitaceae) in germinating tomato seeds. **Acta Physiologia Plantarum** **136** (2): 180-192.
- Lopez-Huertas, E.; Charlton, W.L.; Johnson, B.; Graham, .IA.; Baker, A. 2000. Stress induces peroxisome biogenesis genes. **The Embo Journal** **19**: 6770–6777.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry** **193**: 265-275.
- Macias, F.A.; Molinillo, J.M.; Varela, R.M.; Galindo, J.C. 2007. Allelopathy - a natural alternative for weed control. **Pest. Management. Science**. **63** (4): 327- 348.
- Mazorra, L. M.; Núñez, M; Hechevarría, M.; Coll, F.; Sánchez-Blanco, M.J. 2002. Influence of brassinosteroids on antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures. **Biologia Plantarum** **45**: 593-596.
- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M.; Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Sciences** **9**: 490–498.

- Molnar, K.; Farkas, E. 2010. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. **Zeitschrift für Naturforschung** **65**: 157-173.
- Morales, F.F.; Aguilat, M.I.; Díaz, B.K.; de Santiago-Gómez, J.R.; Hensen, B.L. 2007. Natural diterpenes from *Croton ciliatoglanduliferus* as photosystem II and photosystem I inhibitors in spinach chloroplasts. **Photosynthesis Research** **91** (1): 71-80.
- Munné-Bosch, S.; Alegre, L. 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. **Functional Plant Biology** **31**: 203-216.
- Nelson; David, L.; Cox; Michael, M. 2005. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 4^a edição, W. H. Freeman. ISBN 978-0716743392.
- Oracz, K.; Bailly, C.; Gniazdowska, A.; Come, D.; Corbineau, F.; Bogatek, R. 2007. Induction of oxidative stress by sunflower phytotoxins in germinating mustard seeds. **Journal Chemical Ecology** **33**: 251-64.
- Pavithra, G.M.; Vinayaka, K.S.; Rakesh, K.N.; Junaid, S.; Dileep, N.; Kekuda, P.; Siddiqua, S.; Naik, A.S. 2013. Antimicrobial and antioxidant activities of a macrolichen *Usnea pictoides*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** **3**: 154-160.
- Pereira, E. C. 1998. **Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae a partir de imobilização celular**. Recife, 240p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal de Pernambuco.
- Politycka, B.; Kozłowska, M.; Mielcarz, B. 2004. Cell wall peroxidases in cucumber roots induced by phenolic allelochemicals. **Allelopathy Journal** **13**: 29-36.
- Pompelli, M.F.; França, S.C.; Tigre, R.C.; Oliveira, M.T.; Sacilot, M.; Pereira, E.C. 2013. Spectrophotometric determinations of chloroplastidic pigments in acetone, ethanol and dimethylsulphoxide. **Brazilian Journal of Biosciences** **11**: 52-58.

- Potty, V.H. 1969. Determination of proteins in the presence of phenols and pectins. **Analytical Biochemistry** **29**: 535-539.
- Prasad, M.N.V.; Devi, S.R. 2001. Physiological basis for allelochemical action of ferulic acid. Pp. 27-45. In: Bonjoch, N.P.; Reigosa; Roger, M.J. (Eds.). **Physiological Aspects of Allelopathy**. First European OECD Allelopathy Symposium. Vigo, Spain. Printed by Gamesal, S.A.
- Qin, B.; Perry, L.G.; Browckling, C.D.; Du, J.; Stermitz, F.; Paschke, M.W.; Vivanco, J.M. 2006. Phytotoxic allelochemicals from roots and root exudates of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). **Plant Signaling and Behavior** **1**: 323-7.
- Rezende, C.P.; Pinto, J.C.; Evangelista, A.R.; I.P.A. Santos. 2003. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens. **Boletim Agropecuário** **54**: 1-55.
- Rimando, A.M.; Dayan, F.E.; Czarnota, M.A.; Weston, L.A.; Duke, S.O. 1998. A new photosystem II electron transfer inhibitor from *Sorghum bicolor* (L.). **Journal of Natural Products** **61**: 927-930.
- Romagni, J.G.; Meazza, G.; Nanayakkara, N.P.D.; Dayan, F.E. 2000. The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **FEBS Letters** **480**: 301-305.
- Romagni, J.G.; Rosell, R.C.; Nanayakkara, N.P.D.; Dayan, F.E. 2004. Allelopathy, chemistry and mode of action of allelochemicals. Pp 13-33. **Ecophysiology and potential modes of action for selected lichen secondary metabolites**. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Santiago, R.; de Armas, R.; Legaz, M.E.; Vicente, C. 2008. Separation from *Ustilago scitaminea* of different elicitors which modify the pattern of phenolic accumulation in sugarcane leaves. **Journal of Plant Pathology** **90** (1): 87-96.
- Seigler, D.S. 1996. Chemistry and mechanisms of allelopathic interactions. **Agronomy Journal** **88**: 876-885.

- Silva, C.B. 2009. **Avaliação do potencial de atividade alelopática da parte aérea e subterrânea de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae)**. Dissertação de mestrado. Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
- Singh, H.P.; Batish, D.R.; Kaur, S.; Ramezani, H.; Kohli, R.K. 2002. Comparative phytotoxicity of four monoterpenes against *Cassia occidentalis*. **Annals of Applied Biology** **14**: 111-116.
- Souza Filho, A.P.S. 2006. Proposta metodológica para análise da ocorrência de sinergismo e efeitos potencializadores entre aleloquímicos. **Planta Daninha** **24** (3): 607-610.
- Teerarak, M.; Charoenying, P.; Laosinwattana, C. 2012. Physiological and cellular mechanisms of natural herbicide resource from *Aglaia odorata* Lour. on bioassay plants. **Acta Physiologiae Plantarum** **34**: 1277-1285.
- Tigre, R.C., Silva, N.H, Santos, M.G., Honda, N.K., Falcão, E.P.S, Pereira, E.C. 2012. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** **84**: 125-32.
- Tomás-Barberán, F.; Robins, R. 2007. **Phytochemistry of fruit and vegetables**. Pp. 51-70.
- Trebst, A. 1972. Measurement of Hill reactions and photoreduction. Pp 146-165. In: San Pietro, A. (Ed.). **Methods in Enzymology**. “Photosynthesis and Nitrogen Fixation Part B”. Elsevier, Amsterdam.
- Ushimaru, T.; Kanematsu, S.; Katayama, M.; Tsuji, H. 2001. Antioxidative enzymes in seedlings of *Nelumbo nucifera* germinated under water. **Physiologia Plantarum** **112**: 39-46.
- Vivanco, J.M.; Bais, H.P.; Stermitz, T.R.; Thelen, G.C.; Callaway, R.M. 2004. Biogeochemical variation in community response to root allelochemistry: novel weapons and exotic invasion. **Ecology Letters** **7**: 285- 292.
- Vuleta, A.; Šešljija, D. 2007. **World conference on stress**. Budapest, Hungary. Pp. 193.

- Yamamoto, Y.; Yukiko, Kobayashi; Y.; Matsumoto, H. 2001. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiology** **125**: 199–208.
- Yang, C.M.; Lee, C.N.; Zhou, C.H. 2002. Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*Oryza sativa*) seedlings: I. Inhibition of supply-orientation. **Botanical Bulletin of Academia Sinica** **43**: 299-304.
- Yu, J.Q.; Ye, S.F.; Zhang, M.F.; Hu, W.H. 2003. Effects of root exudates, aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus* L.) and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in Cucumber. **Biochemical Systematics and Ecology** **31**: 129-139.
- Zeng, R.S.; Luo, S.M.; Shi, Y.H.; Shi, M.B.; Tu, C.Y. 2001. Physiological and biochemical mechanism of allelopathy of secalonic acid F on higher plants. **Agronomy Journal** **93**: 72-79.

CAPÍTULO III

EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA NO POTENCIAL ALELOPÁTICO DE *Cladonia verticillaris* SOBRE *Lactuca sativa*

Será submetido a: **Ecotoxicology and nvironmentl Safety**

**EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA NO POTENCIAL ALELOPÁTICO DE
Cladonia verticillaris SOBRE *Lactuca sativa***

R.C. Tigre^a, N.H. da Silva^b, C. Vicente^c, M.E. Legaz^{c*}, E.C. Pereira^d

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^b Departamento de Bioquímica, Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^c Grupo Comunicação Intercelular em Simbiose Vegetal, Faculdade de Biología; Universidad Complutense de Madrid, Av. José Antonio Novais, 12, CEP 28040, Madrid, Espanha

^d Departamento de Ciências Geográficas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP 50.740-901

*Autor correspondente: Fax: +34 1 3945034

E-mail addresses: biotigre@gmail.com (R.C. Tigre), nhsilva@uol.com.br (N.H. Silva), cvicente@bio.ucm.es (C. Vicente), melegaz@bio.ucm.es (M.E. Legaz), Eugenia.pereira@pq.cnpq.br (E.C. Pereira)

RESUMO

A fitotoxicidade de alguns aleloquímicos é atribuída à habilidade que eles possuem para romper processos metabólicos normais nos organismos alvo, e a sua produção e liberação podem ser alteradas por diferentes tipos de estresses. A descoberta destes novos sítios-alvo tem se expandido como estratégia para controle de plantas daninhas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi fornecer uma nova compreensão dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos da ação de *Cladonia verticillaris* na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa*, bem como a influência da radiação gama na produção de compostos alelopáticos desse líquen. Com base nos resultados experimentais, se formulou a hipótese de que os efeitos alelopáticos visíveis no desenvolvimento de *L. sativa* se devem principalmente à perturbação na cadeia transportadora de elétrons e a danos oxidativos. E, que a radiação gama altera a produção de aleloquímicos aumentando a possibilidade desses compostos alcançarem múltiplos alvos. A aquisição de tais conhecimentos pode vir a fornecer uma base racional e científica para a concepção de herbicidas seguros e eficazes.

Palavras-chaves: bioherbicida, estresse oxidativo, fotossistema II, substâncias líquênicas, ácido fumarprotocetrárico, ácido protocetrárico, atranorina

ABSTRACT

The phytotoxicity of some allelochemicals is attributed to the ability they have to break through normal metabolic processes in the target organisms, and their production and release can be altered by different stresses. The discovery of these new target sites has expanded as a strategy for weed control. Thus, the objective was to provide a new understanding of the physiological and biochemical mechanisms of *Cladonia verticillaris* action on germination and initial growth of *Lactuca sativa*, and the influence of gamma radiation in the production of allelopathic compounds that lichen. Based on the experimental results, it was hypothesized that the visible allelopathic effects on the development of *L. sativa* are mainly due to disturbance in the electron transport chain and oxidative damage. And, the gamma radiation alters the production allelochemicals increasing the possibility of such compounds achieve multiple targets. The acquisition of such knowledge may ultimately provide a rational and scientific basis for the design of safe and effective herbicides.

Key-words: bioherbicide, oxidative stress, photosystem II, lichen substances, fumarprotocetraric acid, protocetraric acid, atranorin

1. INTRODUÇÃO

Alelopatia, fenômeno pelo qual metabólitos secundários sintetizados por fungos, líquens, vírus, micro-organismos e plantas que influenciam os sistemas biológicos e agrícolas, por ação estimuladora ou inibidora, é multi-dimensional, ocorrendo constantemente em ecossistemas naturais e antropogênicos (Weir *et al.*, 2004; Gniazdowska e Bogatek, 2005). Interações com os diferentes fatores ambientais, como temperatura, a intensidade luminosa, a disponibilidade de água e nutrientes, textura do solo e a presença de micro-organismos e a radiação desempenham um papel importante na expressão da alelopatia (Kobayashi, 2004). Esses fatores, muitas vezes agem como indutores de estresse que podem influenciar a produção de aleloquímicos pelas espécies doadoras e modificar o efeito de um aleloquímico na planta-alvo (Einhellig, 1999), sendo sua ação diversificada e detectada em níveis moleculares, estruturais, bioquímicos, fisiológicos e ecológicos da organização da planta (Gniazdowska, 2005; Khalaj *et al.*, 2013).

Um dos mais bem caracterizados mecanismos de indução da fitotoxicidade por esses compostos é a inibição da fotossíntese pela evolução do oxigênio através das interações com componentes do fotossistema II (PSII) (Czarnota *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004). Em geral, os vários tipos de estresses ambientais (incluindo

abióticos, xenobióticos e herbicida) medem seu impacto através do estresse oxidativos, causado pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), acompanhado pela ativação do sistema celular antioxidante (Blokhina *et al.*, 2003; Weir *et al.*, 2004). Dessa forma, a geração de EROs tem sido proposta como um dos modos de ação de inibição do crescimento de plantas por aleloquímicos (Weir *et al.*, 2004).

Esses compostos naturais representam um grande campo para a descoberta de novos herbicidas ambientalmente seguros, pois geralmente, esses aleloquímicos apresentam baixa toxicidade aos organismos não alvo de controle, sendo fontes menos agressivas ao ecossistema (Morales *et al.*, 2007). Assim, o controle de plantas daninhas, mediante a aplicação de substâncias com poder alelopático, pode ter uma importância estratégica pela sua atuação seletiva e pelo baixo poder residual (Rizvi *et al.*, 1999).

Devido a poucas informações, dados inconsistentes, e os muitos diferentes papéis ecológicos dos compostos liquênicos (Hyvärinen *et al.*, 2002; Lawrey *et al.*, 2009), o estudo sobre o efeito de fatores ambientais na indução e produção de compostos secundários por abordagens experimentais, tornam-se especialmente importantes.

Assim, sabendo que a produção de aleloquímicos pode ser regulada por diversos fatores ambientais como recém-mencionado, modificando diretamente a sua taxa de produção, é possível que a manipulação de alguns desses fatores aumente a potencialidade das características herbicidas e fitorreguladoras de *Cladonia verticillaris* estudadas por Tigre *et al.* (2012). Ferramentas como estas podem vir a ser utilizadas pelas indústrias agroquímicas como uma alternativa para aumentar a potencialidade dos herbicidas naturais, podendo gerar produtos análogos, diminuindo o problema de resistência das plantas daninhas.

Os compostos liquênicos protegem o líquen das radiações, têm papel adaptativo e atuam como um agente ecoquímico. *Cladonia substellata* ao receber doses crescentes de radiação gama, aumenta progressivamente sua produção de ácido úsnico, até certo limite de tolerância (Silva *et al.*, 2010), assim como *C. verticillaris* submetida a mesma fonte radioativa, ou à radiação UV aumenta a produção de seus compostos fenólicos, com ênfase ao ácido fumarprotocetrárico e atranorina (Silva, 2011). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses da radiação gama na

produção aleloquímica de *C. verticillaris* e a ação destas substâncias no fotossistema II (PSII) e no metabolismo antioxidante enzimático de *Lactuca sativa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal e Liquênico

Cladonia verticillaris, espécie de líquen endêmica do Brasil, foi coletada manualmente no município de Saloá (PE) a 273 km de Recife, área de Cerrado – tabuleiro de interior), e acondicionada em caixas de papel à temperatura ambiente ($28^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$), até a realização dos experimentos. O material foi identificado e sua exsicata depositada no herbário UFP do Departamento de Botânica da UFPE com o registro 52.299. *Parmotrema dillatatum* (Vainio) Hale, usada para extração do ácido protocetrárico (PRO) foi coletada no mesmo local, sendo seu registro 39.893. Sementes de *Lactuca sativa* var. Grand Rapids L. foram adquiridas comercialmente da Isla Pak, Porto Alegre, Brasil.

2.2 Irradiação gama de *Cladonia verticillaris*

Amostras líquênicas foram colocadas em envelopes de papel e submetidas à radiação em irradiador gama (Co-60 – irradiador, Radionies Laboratory), recebendo doses de 10, 50 e 100 Gy com taxa de dose: de 6,912 kGy/h. Como controle foram utilizadas amostras não submetidas à fonte radioativa.

2.3 Extração dos aleloquímicos de *Cladonia verticillaris*

Talos líquênicos irradiados (doses de 0, 10, 50 e 100 Gy) foram submetidos à extração em série em um aparelho de Soxhlet com éter, clorofórmio, acetona e metanol de acordo com a série eluotrópica. Os solventes foram obtidos da Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, Brasil. Para cada 2,0 L de cada solvente, foram utilizados 150 g de *C. verticillaris*. Após a extração, as soluções foram filtradas e evaporadas a vácuo.

2.4 Isolamento e purificação do ácido fumarprotocetrárico (FUM) e ácido protocetrárico (PRO)

O principal componente da espécie em estudo, o FUM, foi isolado e purificado a partir do extrato acetônico (EA) de *C. verticillaris*. Este, após concentrado foi lavado em funil poroso G-4 com acetona, como descrito por Pereira (1998). PRO foi extraído do líquen *Parmotrema dilatatum* (Vain.) Hale, utilizando diclorometano, seguido por acetona a temperatura de aproximadamente 45°C, como descrito por Tigre *et al.* (2012). A atranorina (ATR) foi obtida comercialmente na Sigma Química LTDA, Brasil.

2.5 Separação e quantificação dos aleloquímicos de *Cladonia verticillaris*

A separação e quantificação dos aleloquímicos majoritários de *C. verticillaris* foi realizada por RP-HPLC em um cromatógrafo líquido usando Spectra Physics 8810 (Thermo Electron Corporation, Asheville, NC, USA), equipado com uma bomba SP 8810, um injetor Rheodine, um detector UV-Visível SP8490 e o programa DateApex Clarity Lite™ para Windows (DateApex Ltda., Praha, Czech Republic) para obtenção e integração dos dados. Os extratos etéreos (EE), clorofórmicos (EC), EA e metanólicos (EM) irradiados ou não irradiados foram dissolvidos em fase móvel antes de serem injetados. As condições de análises foram: Coluna de fase reversa (RP), Mediterranea Sea C18 de Teknokroma, S.C.L., Espanha; dp 5 µm, L, 120 mm; d.i. 4,6 mm; pressão em coluna, 70 bar. Fase móvel [acetoneitrila]:[acetoneitrila: ácido acético a 4% em água Mili-Q (80:20, v/v)] [70:30, v/v], isocrática a 1 mL·min⁻¹. Volume de injeção: 10 µL. Temperatura 22°C±0,1°C. Comprimento de onda: 254 nm. Taxa de detecção: 0,0005 unidades (Santiago *et al.*, 2008). A quantificação de ATR, FUM e PRO se realizou por meio da interpolação da resposta do detector, em contas de área e na correspondente reta de calibração. Esta foi construída com cada aleloquímico, calculando a relação entre a conta de área obtida a partir de concentrações crescentes de cada composto (entre 290 e 400 µg·mL⁻¹ para FUM, 10-500 µg·mL⁻¹ para PRO e 30-400 µg·mL⁻¹ para ATR).

2.6 Bioensaio de germinação (Pré-emergente)

Os testes foram realizados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo duas folhas de papel de filtro umedecidas com 5 mL por placa com EE, EC, EA e EM a 1,0 e 2,5 g·dm⁻³ e de FUM e PRO a 0,1 e 1,0 g·dm⁻³, distribuídos uniformemente. As placas com os papéis foram esterilizadas. O controle negativo foi obtido com o uso de água destilada e o controle positivo pela utilização do herbicida clortoluron (HC) na

concentração 0,1 e 0,2 g.dm⁻³. Posteriormente foram semeadas em cada placa 50 sementes de *L. sativa*. O experimento foi conduzido em câmara de germinação com temperatura de 22°C±0,2, fotoperíodo de 12 h e umidade relativa de 75% por um período de 12 dias.

2.7 Bioensaio de crescimento (Pós-emergente)

Foi realizado semelhante ao bioensaio pré-emergente, porém as sementes foram germinadas previamente em água destilada até a protusão radicular de 2 mm (Brasil, 2009) e somente depois transferidas para as soluções-teste. As plântulas foram incubadas por 13 dias após o transplante.

2.8 Isolamento das membranas tilacoidais e medida da reação de Hill

A preparação da suspensão das lamelas cloroplastídicas foi realizada de acordo com o protocolo de Trebest (1972) com modificações que consistiu na maceração a frio de 40 mg de folhas de *L. sativa* em 1mL de tampão fosfato sódico (TFS) 25mM pH 6,9, contendo KCl 30 mM e sacarose 400 mM. Este homogenado foi centrifugado a 1.000 G durante dez min. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 1mL de tampão supracitado.

A quantificação da reação de Hill foi realizada na mistura de 500 µL da suspensão de lamelas tilacoidais e 500 µL de TFS mM, pH 6,9. Em espectrofotômetro, uma vez ajustado o “zero” de absorbância a 600nm, se adicionaram 75 µL de 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) 0,52 µM e imediatamente submeteu-se a amostra a uma fonte luminosa de 750 µmol.m⁻².s⁻¹ a uma distância de 20 cm, calculando o delta de absorbância em função do tempo (Trebest, 1972). A atividade do Fotossistema II (PSII) foi expressa pela variação da abosrbância a 600nm por minuto e µg de clorofila a+b.

2.9 Determinação dos pigmentos fotossintéticos

Alíquotas de 400 µL da suspensão de lamelas cloroplastídicas, isoladas segundo o protocolo citado no item 2.8, foram adicionadas a 400 µL de acetona P.A. A amostra foi agitada em vórtex e centrifugada a 8.500 x g durante 10 min, descartando o *pellet* após centrifugação. Foram realizadas leituras no sobrenadante nas absorbâncias a 480, 649, 665 e 710 nm em espectrofotômetro Unicam Helios β (Thermo Fisher

Sci.Inc., Rockford, IL, USA), o branco consistiu em acetona a 50% (v/v). A concentração de moléculas de pigmentos foi calculada usando as expressões descritas por Pompelli *et al.* (2013).

2.10 Determinação das atividades enzimáticas peroxidase, polifenoloxidase e catalase

2.10.1 Obtenção dos extratos livres de células (ELC)

ELC foi obtido através da maceração a frio de 40 mg de folhas da planta teste em 1 mL de TFS 75 mM, pH 6,9. O homogenato foi centrifugado a 19.000 x g por 20 min., a 4°C. Posteriormente o *pellet* foi descartado e no sobrenadante foram quantificadas as atividades enzimáticas e o teor de proteínas.

2.10.2 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951) com modificações para eliminação do excesso de fenóis (Potty, 1969). Para isto, foram utilizados 200 µL de ELC que foram precipitados com 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v) e centrifugado a 15.000 x g por 15 min. a 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido com 300 µL de TFS mM, pH 6,9, sendo neutralizado com 22 µL de NaOH 0,1 N. A partir deste extrato foram quantificadas as proteínas pelo método de Lowry *et al.* (1951) utilizando soroalbumina bovina como padrão.

2.10.3 Determinação das atividades enzimáticas

2.10.3.1 Atividade peroxidase – POD (EC 1.11.1)

Alíquotas de 50 µL de ELC foram adicionadas a 440 µL de TFS 75 mM, pH 6,9 e 50 µL de pirogolol 200 mM. Essa mistura foi homogeneizada e imediatamente foram realizadas medidas de absorbância a 420nm a 25°C, ajustando a “zero”. Posteriormente foram adicionados 50 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 200 mM, medindo-se em seguida a variação de absorbância no tempo para medir a formação de purpurogalina.

2.10.3.2 Atividade polifenoloxidase – PPO (EC 1.14.18.1)

Para mistura desta reação foram utilizadas 400 µL de TFS 75 mM, pH 6,9 e 50 µL de ELC que foram medidos a 420 nm a 25°C ajustando a “zero” de absorbância. Em seguida, foram adicionados 50 µL de pirogalol 200 mM, medindo a quantidade de purpurogalina formada em função do delta de absorbância em relação ao tempo.

2.10.3.3 Atividade catalase – CAT (EC 1.11.1.6)

A mistura desta reação foi obtida por 400 µL de TFS 75 mM, pH 6,9 e 50 µL de ELC. Uma vez homogeneizada, se ajustou o “zero” de absorbância a 240nm a 25°C e em seguida foram adicionados 50 µL de H₂O₂ 200 mM medindo a absorbância a cada 30 s, por 5 min.

As atividades enzimáticas de POD, PPO e CAT foram determinadas pelo método descrito por Kar e Mishra (1976) com as modificações descritas nos itens 2.10.3.1, 2.10.3.2 e 2.10.3.3, respectivamente. A unidade da atividade específica de cada enzima se definiu pela variação de absorbância em função do tempo, por massa (mg) de proteínas.

2.11 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso com três repetições. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e quando os efeitos foram significativos, aplicou-se o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Bioensaio Pré-emergente

Ao final dos 12 dias de germinação das plântulas de *L. sativa* em contato com aleloquímicos produzidos por *C. verticillaris* irradiada com diferentes doses de radiação gama (doses de 0, 10, 50 e 100 Gy), foi possível observar uma interação dose/concentração para quase todos os extratos nos diferentes parâmetros analisados.

Notou-se que o EE foi o que produziu as maiores alterações na concentração dos pigmentos fotossintéticos, independente da dose de radiação, pois todos os seus extratos irradiados e não irradiados diminuíram a concentração de clorofila a (Chl-a - Fig. 1A), clorofila b (Chl-b Fig. 1E) e clorofila total (Chl-total - 2A), não interferindo no teor de carotenoides (Car - Fig. 1I). Os extratos mais significativos dessas reduções foram os extratos do líquen submetido às doses de 50 Gy 2,5 g.dm⁻³ ou 100 Gy 1,0 g.dm⁻³ com reduções de até 85%. Porém de todos os extratos analisados, EE, EC, EA e EM, os EEs juntamente com o PRO 1,0 g.dm⁻³ (Fig. 1A-D) foram os únicos que reduziram a concentração de Chl-a. Apesar de não encontrar concentrações significativas de PRO nos EEs, nem mesmo com suas interações FUM e ATR, que justifiquem essas ações tão diferenciadas dos demais extratos (Tab. 1), é possível que as ações observadas dos EEs estejam relacionadas às três substâncias não identificadas, SNI (Tab. 2), ou ainda a interação do PRO com essas SNIs, através de uma ação sinérgica, uma vez que se constatou que o PRO induz reduções dos pigmentos fotossintéticos como observado nas figuras 1A-L e 2A-D.

Essas SNIs (1, 2 e 3) juntas, só foram evidenciadas também nos EMs sem radiação e com radiação 10 Gy, porém em concentrações muito elevadas, o que pode estar relacionada à alta polaridade do metanol. Apesar desses dois extratos, apresentarem concentrações significativas de PRO, FUM e ATR, sendo bastante evidenciada na dose 10 Gy, eles não induziram a nenhuma alteração nos pigmentos fotossintéticos (Fig. 1D, 1H, 1L e 2D) e, por conseguinte, não afetaram a atividade do PSII (Fig. 2H). Sendo assim, é possível que as três SNIs estejam trabalhando em antagonismo com os aleloquímicos identificados no EM. Contudo, a dose 50 e 100 Gy 1,0 g.dm⁻³ do EM reduziu a concentração de Car em 98% (Fig. 1L) e em talos submetidos a 100 Gy 2,5 g.dm⁻³ a concentração de Chl-b (Fig. 1H) e Chl-total

(Fig. 2D) encontradas nas plântulas a eles submetidas foi de 33,33 e 66,52%, respectivamente. O mesmo foi observado no EA, onde somente as doses 50 e 100 Gy influenciaram o teor de Chl-total em até 72% (Fig. 2C) e 100 Gy a concentração de Chl-b em 92,06% (Fig.1G).

Estes resultados com EA e EM demonstram que doses altas de radiação gama aumentam a potencialidade dos aleloquímicos de alcançarem novos sítios-alvo. É nítido observar nas tabelas 1 e 2, que a radiação gama alterou o metabolismo de *C. verticillaris*, interferindo na produção dos seus compostos fenólicos. Mudança metabólica da produção dos compostos liquênicos mediante a adição de radiação gama também foram descritos por Silva *et al.* (2010) com *Cladonia substellata*, que relataram incrementos na biossíntese de ácido úsnico à medida em que se aumentava a dose de radiação, havendo um limite para essa dose. Foi observado que quando as partes aéreas de *Mikania glomerata* foram irradiadas com raios gama, o teor de cumarina aumentou, enquanto a concentração de ácido o-cumárico diminuiu (Peregrino e Leitão, 2005). Alsaadawi *et al.* (1985) relataram que a exposição de sementes de sorgo à radiação gama aumentou significativamente a atividade alelopática de extratos aquosos, exsudatos radiculares e resíduos em decomposição.

Verificou-se ainda, que a radiação gerou uma significativa diminuição da concentração de PRO e ATR nos EAs, todavia a redução na produção desses compostos não explica os resultados observados na Figura 1G e 2C, pois a dose 10 Gy também produziu a redução dos metabólitos, porém não interferiu no sistema fotossintético, levando a pensar que esse resultado pode estar relacionado com a ausência da SNI 3. Porém a radiação gerou resultados diferentes a esses no EM, aumentando expressivamente a quantidade de FUM, PRO e ATR. Entretanto, apenas a dose 50 e 100 Gy provocaram alterações nos parâmetros estudados que podem estar associados à ausência da SNI 1. O EC não suscitou nenhuma intervenção no aparelho fotossintético estudado, o que pode estar relacionado com as baixas concentrações de PRO nos extratos de talos irradiados e, à ausência de FUM e ATR nos não irradiados, demonstrando a importância da interação dessas substâncias para as respostas alelopáticas.

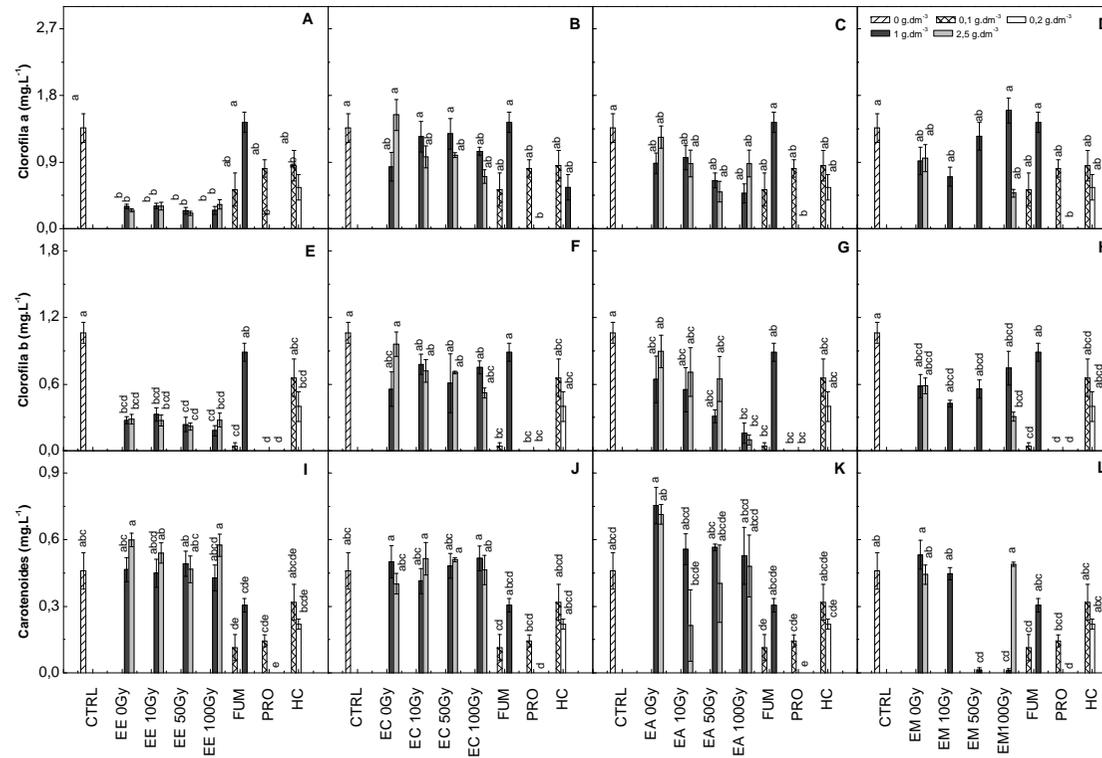


Figura 1. Valores médios da concentração de clorofila a (A-D), clorofila b (E-H) e carotenoides (I-L) em plântulas de *Lactuca sativa* germinadas em diferentes extratos [EE: extrato etéreo (A, E e I), EC: extrato clorofórmico (B, F e J), EA: extrato acetônico (C, G e K) e EM: extrato metanólico (D, H e L)] de *Cladonia verticillaris* irradiada com diferentes doses de radiação gama (doses de 0, 10, 50 e 100 Gy) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³, e seus aleloquímicos isolados (ácido fumarprotocetrárico: FUM e ácido protocetrárico: PRO) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 12 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05), médias ± SE, n = 3.

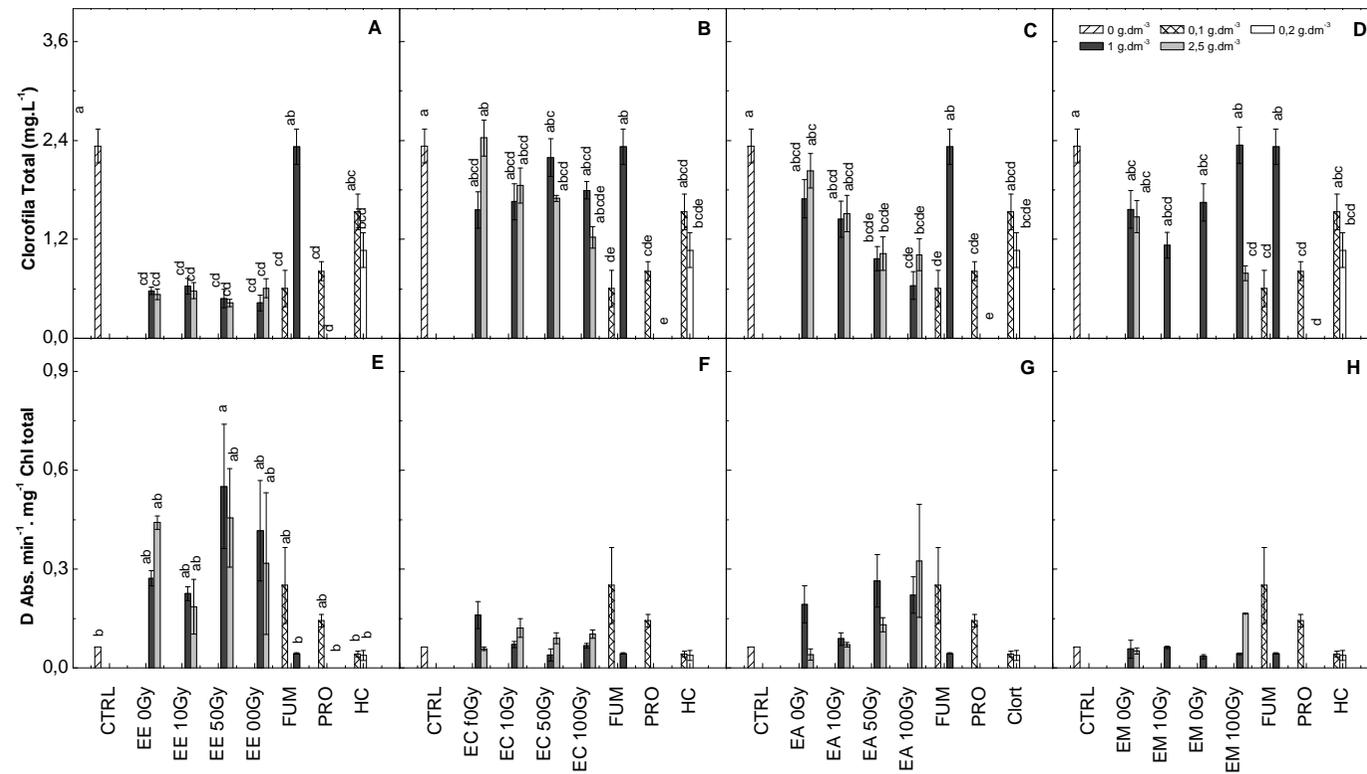


Figura 2. Valores médios da concentração de clorofila total (A-D) e atividade do fotossistema II (E-H) de plântulas de *Lactuca sativa* germinadas em diferentes extratos [EE: extrato etéreo (A, E e I), EC: extrato clorofórmico (B, F e J), EA: extrato acetônico (C, G e K) e EM: extrato metanólico (D, H e L)] de *Cladonia verticillaris* irradiada com diferentes doses de radiação gama (doses de 0, 10, 50 e 100 Gy) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³, e seus aleloquímicos isolados (ácido fumarprotocetrárico: FUM e ácido protocetrárico: PRO) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 12 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05), médias ± SE, n = 3.

Tabela 1. Análises dos extratos e dos aleloquímicos purificados (FUM- ácido fumarprotocetrárico; PRO – ácido proocetrárico; ATR – atranorina) dos talos de *Cladonia verticillaris* submetidos ou não à radiação gama, submetidas a análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), médias \pm SE, n = 3.

EXTRATOS/ DOSES DE RADIAÇÃO		$t_{R^*} \approx 6,6$	$t_R \approx 7,8$	$t_R \approx 27,8$	FUM/PRO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	FUM/ATR ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	PRO/ATR ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	FUM+PRO+ATR ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
		PRO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	FUM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ATR ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
Etéreo	0 Gy	3,290 \pm 0,01	8,31 \pm 0,03	0,09 \pm 0,04	2,51 \pm 0,03	90,32 \pm 0,03	35,85 \pm 0,03	12,06 \pm 0,07
	10 GY	1,2480 \pm 0,01	6,05 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01	4,84 \pm 0,01	38,87 \pm 0,03	8,01 \pm 0,06	7,52 \pm 0,05
	50 GY	2,230 \pm 0,03	11,37 \pm 0,06	0,21 \pm 0,01	5,09 \pm 0,06	51,92 \pm 0,01	10,19 \pm 0,05	13,72 \pm 0,01
	100 GY	1,800 \pm 0,01	9,13 \pm 0,04	0,12 \pm 0,01	5,05 \pm 0,03	74,90 \pm 0,05	14,82 \pm 0,07	11,55 \pm 0,03
Clorofórmico	0 Gy	1,02 \pm 0,05	4,26 \pm 0,01	0,61 \pm 0,03	4,17 \pm 0,03	6,94 \pm 0,03	1,66 \pm 0,01	6,09 \pm 0,05
	10 GY	1,39 \pm 0,02	6,84 \pm 0,03	0,27 \pm 0,04	4,90 \pm 0,02	24,66 \pm 0,01	5,02 \pm 0,02	9,02 \pm 0,01
	50 GY	1,34 \pm 0,03	7,79 \pm 0,06	0,77 \pm 0,02	5,81 \pm 0,07	10,02 \pm 0,03	1,72 \pm 0,01	9,20 \pm 0,03
	100 GY	1,30 \pm 0,06	7,13 \pm 0,04	0,07 \pm 0,06	5,47 \pm 0,07	101,05 \pm 0,05	18,46 \pm 0,06	9,60 \pm 0,05
Acetônico	0 Gy	22,09 \pm 0,05	12,10 \pm 0,03	1,16 \pm 0,01	0,54 \pm 0,05	10,42 \pm 0,03	19,03 \pm 0,01	35,26 \pm 0,03
	10 GY	3,41 \pm 0,01	12,91 \pm 0,05	0,38 \pm 0,02	3,78 \pm 0,01	33,69 \pm 0,01	8,90 \pm 0,03	16,65 \pm 0,01
	50 GY	3,25 \pm 0,03	13,19 \pm 0,05	0,32 \pm 0,03	4,05 \pm 0,02	40,42 \pm 0,07	9,96 \pm 0,02	16,74 \pm 0,01
	100 GY	3,79 \pm 0,02	13,20 \pm 0,04	0,30 \pm 0,06	3,47 \pm 0,03	43,80 \pm 0,07	12,59 \pm 0,02	17,18 \pm 0,03
Metanólico	0 Gy	4,55 \pm 0,05	11,25 \pm 0,04	0,18 \pm 0,05	2,47 \pm 0,05	59,59 \pm 0,05	24,11 \pm 0,01	15,81 \pm 0,06
	10 GY	35,04 \pm 0,01	20,10 \pm 0,04	58,27 \pm 0,01	0,57 \pm 0,03	0,34 \pm 0,03	0,60 \pm 0,01	101,63 \pm 0,01
	50 GY	42,86 \pm 0,04	31,88 \pm 0,02	16,47 \pm 0,03	0,74 \pm 0,06	1,93 \pm 0,03	2,60 \pm 0,04	121,23 \pm 0,04
	100 GY	54,65 \pm 0,03	56,16 \pm 0,02	5,65 \pm 0,02	1,02 \pm 0,07	9,93 \pm 0,07	9,67 \pm 0,02	172,53 \pm 0,06

* Tempo de retenção em minutos

Tabela 2. Análises das substâncias detectadas nos extratos de talos de *Cladonia verticillaris* irradiada ou não irradiada com raios gama que foram submetidos a análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), médias \pm SE, n = 3.

TRATAMENTOS		$t_R^* \approx 8,6$ SNI** 1 C.A***	$t_R \approx 9,3$ SNI 2 C.A	$t_R \approx 10,22$ SNI 3 C.A
Etéreo	0 Gy	60,19 \pm 0,02	3,43 \pm 0,03	0,10 \pm 0,02
	10 Gy	14,99 \pm 0,04	12,71 \pm 0,02	59,09 \pm 0,03
	50 Gy	71,40 \pm 0,06	11,98 \pm 0,05	25,74 \pm 0,04
	100 Gy	40,14 \pm 0,02	10,68 \pm 0,02	24,94 \pm 0,05
Clorofórmico	0 Gy	33685,69 \pm 0,05	58235,68 \pm 0,03	-
	10 Gy	20,10 \pm 0,03	14,27 \pm 0,03	105,04 \pm 0,02
	50 Gy	0 \pm 0,00	-	26,03 \pm 0,03
	100 Gy	66,35 \pm 0,02	-	35,91 \pm 0,02
Acetônico	0 Gy	794,87 \pm 0,03	-	32,09 \pm 0,04
	10 Gy	-	36,32 \pm 0,05	-
	50 Gy	-	30,56 \pm 0,04	85,62 \pm 0,04
	100 Gy	-	93,99 \pm 0,05	38,49 \pm 0,03
Metanólico	0 Gy	10424,07 \pm 0,05	1,79 \pm 0,03	31,45 \pm 0,03
	10 Gy	56270,51 \pm 0,02	38547,95 \pm 0,03	8601,86 \pm 0,05
	50 Gy	-	33354,27 \pm 0,04	18530,61 \pm 0,06
	100 Gy	-	52616,58 \pm 0,06	17026,11 \pm 0,03

* Tempo de retenção em minutos; ** Substância não identificada; *** Contas de área

O FUM 0,1 g.dm⁻³ reduziu o teor de Chl-b (Fig. 1E-H), Car (Fig. 1I e 1L) e Chl-total (Fig. 2A-D) gerando inibições de até 97,17%. O HC 0,2 g.dm⁻³, reduziu a concentração de Car apenas em relação ao EE (Fig. 1E) e de Chl-total em 54,50%. Diante disso, é possível notar que os extratos e as substâncias isoladas de *C. verticillaris* no bioensaio pré-emergente são mais eficazes na perturbação da concentração dos pigmentos fotossintéticos do que o HC.

O teor de clorofila também foi diminuído por ácidos fenólicos em arroz (Yang *et al.*, 2002), ácido secalônico em sorgo (Zeng *et al.*, 2001) e monoterpenos em *Cassia occidentalis* (Singh *et al.*, 2002). Silva (2009) também observou diminuição na produção de clorofila em *L. sativa* e *Allium cepa* quando tratadas com extrato etanólico e todas as frações da parte aérea e parte subterrânea de *Hydrocotyle bonariensis*.

Analisando a atividade do PSII, verificou-se que de todos os extratos, EE, EC, EA e EM, apenas o EE 50 Gy 1,0 g.dm⁻³ influenciou esse parâmetro com estímulo de até 816,66% (Fig. 2E). Apesar de todos os EEs reduzirem os pigmentos fotossintéticos, apenas o EE 50 Gy 1,0 g.dm⁻³ alterou a atividade do PSII.

Nos estudos com aleloquímicos, a degradação da clorofila tem sido relacionada como um dos sintomas da interferência dessas substâncias sobre as plantas (Rice, 1984; Singh *et al.*, 2002). Contudo, ainda não está claro o mecanismo pelo qual ocorre a redução da clorofila quando plantas são tratadas com aleloquímicos, podendo haver dois fatores para essa causa: degradação da clorofila ou inibição de sua síntese (Mg-porfirina). Porém, a única confirmação realizada nesses estudos, é o fato da redução no teor de clorofila afetar drasticamente as taxas fotossintéticas, comprometendo o desenvolvimento das plantas (Yu *et al.*, 2003). Todavia, não foi observado neste bioensaio, pois apesar da diminuição do teor de clorofilas, a atividade do PSII foi estimulada.

A concentração de aleloquímicos na planta-alvo resulta em estresse químico que pode gerar o aumento da taxa fotossintética, como estratégia de sobrevivência. Séries de análogos de ácidos rododadônico também causaram um aumento na atividade de PSII em relação aos controles (Romagni *et al.*, 2004).

Células fotossintéticas são propensas ao estresse oxidativo, pois elas contêm uma série de pigmentos fotossensibilizantes que produzem e consomem oxigênio, sendo o sistema de transporte de elétrons fotossintéticos a principal fonte de EROs em tecidos vegetais (Asada, 1997). Estes compostos são produzidos de forma contínua pelas plantas como produtos do metabolismo aeróbio e, dependendo da sua natureza, podem ser removidos por vários mecanismos celulares (Apel e Hirt, 2004). As atividades enzimáticas de POD, PPO e CAT têm sido extensivamente estudadas em vegetais, devido ao seu interesse, entre outras coisas, para a capacidade de remover EROs.

Ao examinar as atividades das enzimas oxidativas, verificou-se que todos os tratamentos reduziram a atividade da POD com decréscimos de aproximadamente 54% causado, sobretudo, pelo EE 10 Gy 2,5 g.dm⁻³ e de 67% pelo HC 0,1 g.dm⁻³ (Fig. 3A-C), e apenas o EA sem radiação ou irradiado 10 Gy inibiu a concentração de PPO em 100% (Fig. 3F). Esses resultados indicam que os aleloquímicos de *C.*

verticillaris podem induzir danos oxidativos visualizados através da redução da POD, visto que esta é uma das enzimas responsáveis pela eliminação do radical superóxido (O_2^-), que catalisa o O_2^- em H_2O_2 , protegendo as células dos efeitos tóxicos desses radicais (Del Rio *et al.*, 2002). Entretanto, os níveis intracelulares de H_2O_2 são regulados por outras enzimas, como a CAT que atuam transformando as EROs intermediárias em água (Blokhina *et al.*, 2003). Na figura 3G-I, observa-se que a CAT não foi alterada por nenhum tratamento, o que pode estar relacionado com a manutenção do equilíbrio dessas células, através do seu elevado *turnover* (k_{cat}) (Nelson *et al.*, 2005), ou a sua localização restrita e baixa afinidade pelo substrato. Assim, a participação da CAT no mecanismo de eliminação de H_2O_2 pode ser bem limitada, como sugerem Cakmak *et al.* (1993).

Portanto, torna-se claro que os compostos fenólicos de *C. verticillaris* causam estresse aleloquímico que produz um desequilíbrio como evidenciado pela alteração da atividade das enzimas oxidativas e do PSII. Contudo, não se pode assegurar a toxicidade destes compostos devido o potencial de desintoxicação da planta-alvo. Em adição, fenóis liquênicos têm sido descritos como poderosos antioxidantes (Kranner e Birtić, 2005), agindo como agentes desintoxicadores de EROs (Pavithra *et al.*, 2013).

Weir *et al.* (2004) sugerem que em alguns casos os aleloquímicos podem estar diretamente envolvidos na inibição de enzimas oxidativas, deixando as plantas vulneráveis aos danos oxidativos. Lara-Nunez *et al.* (2009) relataram a ocorrência de danos oxidativos causados por lixiviado aquoso de *Sciurus deppei* em *Lycopersicon esculentum*, e Einhellung (2004) observou o aumento de EROs e a diminuição de POD causado pelo ácido cinâmico, e Zeng *et al.* (2001) pelo ácido secalônico F, produzido pelo fungo *Aspergillus japonicus* em *Bidens pilosa*. Resultados semelhantes da redução de PPO foram observados por Thipayong *et al.* (2004).

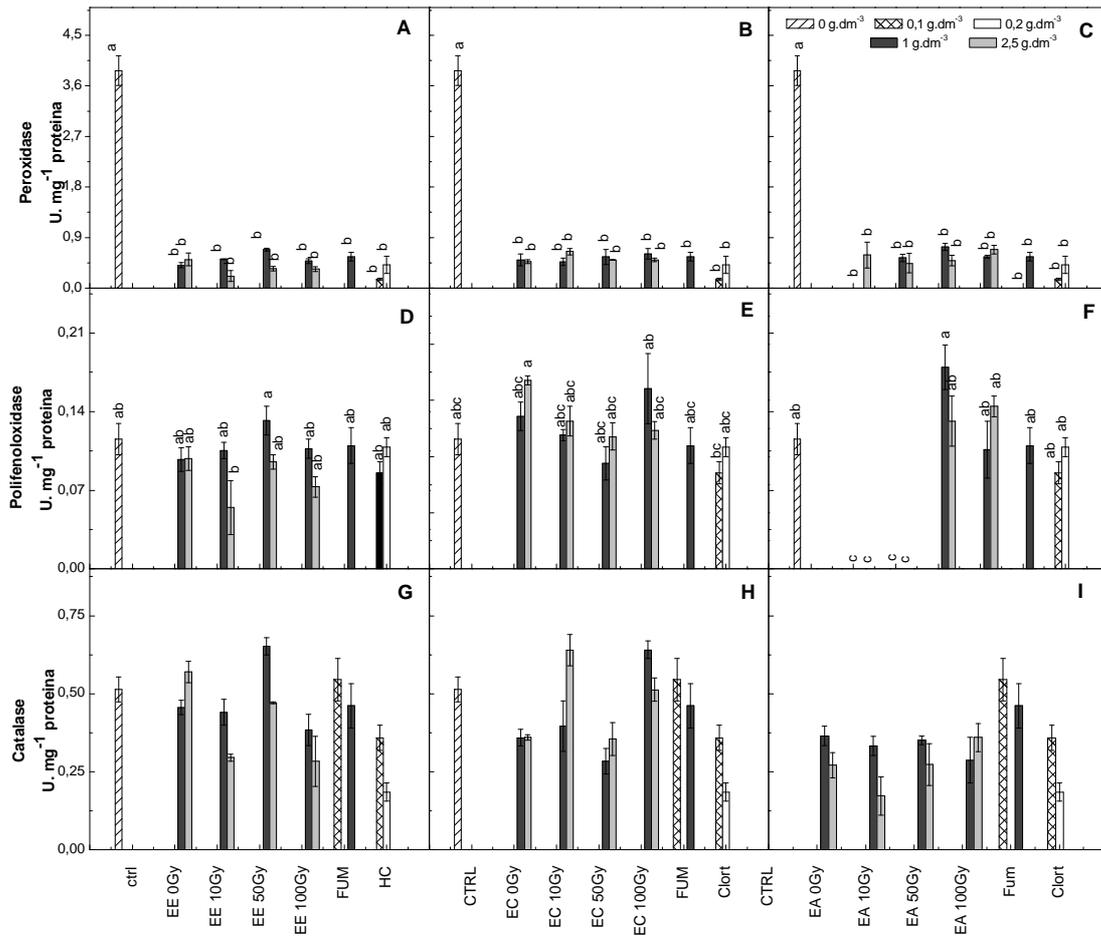


Figura 3. Valores médios da atividade de peroxidase (A-C), polifenoloxidase (D-F) e catalase (G-I) de folhas de *Lactuca sativa* germinadas em diferentes extratos [EE: extrato etéreo (A, D e G), EC: extrato clorofórmico (B, E e H) e EA: extrato acetônico (C, F e I)] de *Cladonia verticillaris* irradiada com diferentes doses de radiação gama (doses de 0, 10, 50 e 100 Gy) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³, e ácido fumarprotocetrárico (FUM) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 12 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), médias \pm SE, $n = 3$.

3.1 Bioensaio Pós-emergente

O efeito da radiação no metabolismo dos aleloquímicos de *C. verticillaris* neste bioensaio produziu diferentes ações nos processos fisiológicos e bioquímicos de *L. sativa* que variaram em função do extrato/dose de radiação/concentração.

Observou-se que com exceção do EE 50 ou 100 Gy e do EC 10 Gy, todos os extratos aumentaram a concentração de Chl-a em até 661% (Fig. 4A-C). A Chl-b também teve a sua concentração majorada com acréscimo de aproximadamente 83% induzida apenas pelos EAs (Fig. 4F). O pigmento Car apresentou respostas de estímulo e redução de sua concentração, sendo o EE sem radiação e 10 Gy os indutores de estímulo (67,44%) e os inibidores o EE e EC 100 Gy, tendo ação similar ao HC, com inibições de até 81% (Fig. 4G-I). A Chl-total foi estimulada pelo EE 1,0 g.dm⁻³ e EC 2,5 g.dm⁻³ sem radiação e por todos os EAs com incrementos variando de 270 a 550% (Fig. 4J-L). Diante dessas análises, constatou-se que as ações observadas nos pigmentos fotossintéticos pelos extratos não são atribuídas ao FUM, ou pelo menos puramente a ele, visto que o mesmo não produziu nenhuma alteração nesses pigmentos. Assim, é possível que os resultados desses parâmetros sejam derivados de uma ação sinérgica ou antagônica.

Análise da atividade do PSII tem sido utilizada como um indicador do estado fisiológico de organismos fotossintetizantes (Mobin e Khan, 2006). Neste contexto, o presente estudo utilizando cloroplastos intactos e membranas tilacoidais demonstraram que os compostos fenólicos de *C. verticillaris* inibem o PSII. Constatou-se que com exceção do EE 50 Gy, todos os tratamentos produziram uma diminuição da atividade do PSII (Fig. 4M-O), sendo sua expressividade dependente da concentração, com reduções variando de 47% (EC 10 Gy 1,0 g.dm⁻³ e 100 Gy 2,5 g.dm⁻³) a 96% (EA 100 Gy 2,5 g.dm⁻³) nos extratos, estando o EA agindo de forma análoga ao HC (94%). Isso pode estar impedindo a redução de plastoquinona B (QB), interrompendo a cadeia transportadora de elétrons entre plastoquinona A (QA) e QB, vinculada sobre a proteína D1 do PSII como observado por Gonzales *et al.* (1997) e Czarnota *et al.* (2001) com sorgoleona, uma substância presente no *Sorghum bicolor*. Este composto foi identificado como um inibidor do PSII mais eficaz do que o herbicida atrazina ao nível molecular (Rimando *et al.*, 1998).

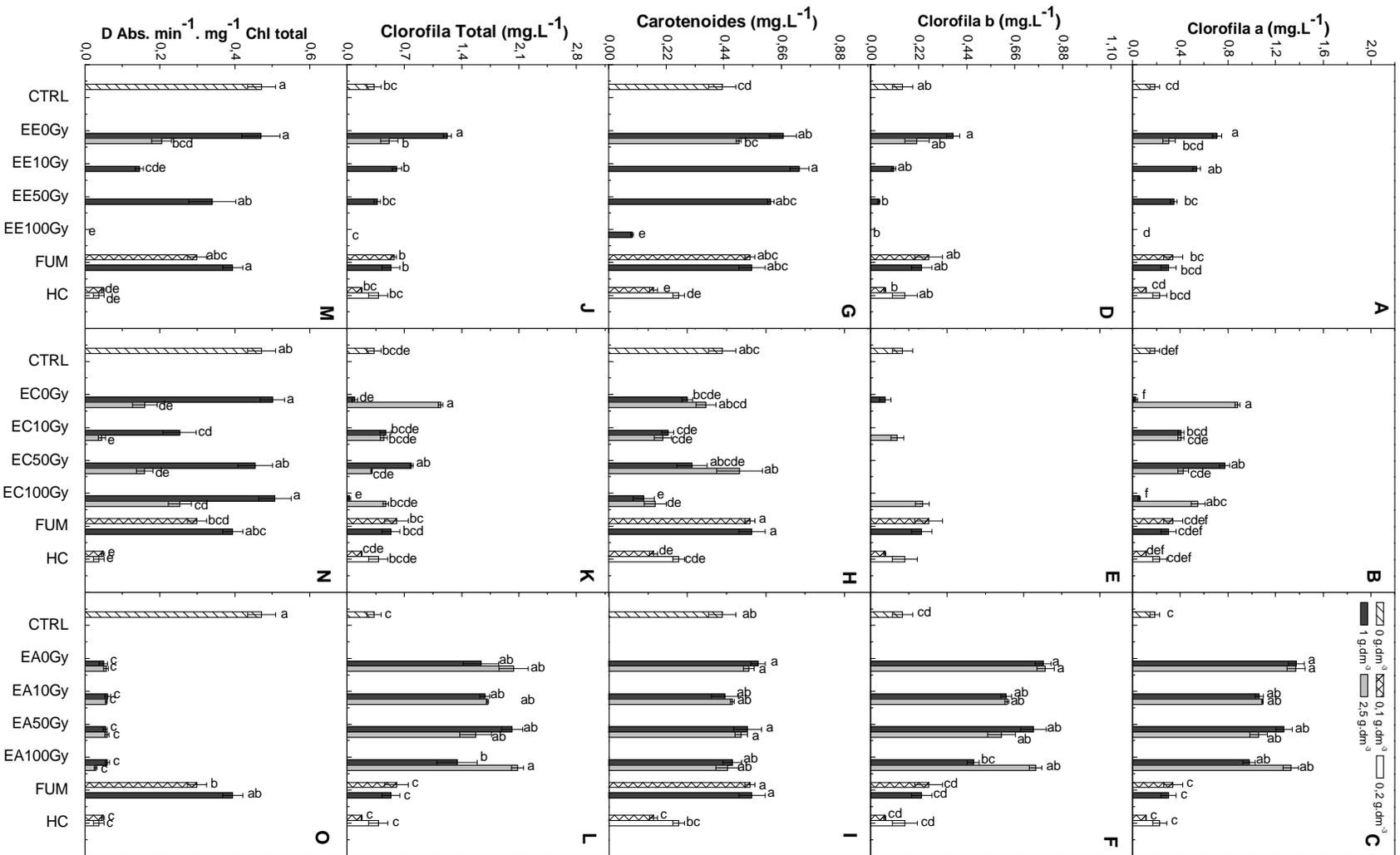


Figura 4. Valores médios da concentração de clorofila a (A-C), clorofila b (D-F), carotenoides (G-I), clorofila total (J-L) e atividade do fotossistema II (M-O) de plântulas de *Lactuca sativa* germinadas previamente em água e depois transferidas para

os diferentes extratos [EE: extrato etéreo (A, D, G, J e M), EC: extrato clorofórmico (B, E, H, K e N) e EA: extrato acetônico (C, F, I, L e O)] de *Cladonia verticillaris* irradiada com diferentes doses de radiação gama (doses de 0, 10, 50 e 100 Gy) na concentração 1,0 e 2,5 g.dm⁻³, e ácido fumarprotocetrárico (FUM) na concentração 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) na concentração 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 15 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p <0,05), médias ± SE, n = 3.

Moléculas mais complexas, como o limonóide odoratol, terpeno isolado a partir de *Cedrela odorata*, a macrolactona tetrassacárido tricolorin A, isolada a partir de *Ipomoea tricolor* (Achnine *et al.*, 1998; 1999), o traquilobânico diterpeno traquilobânico-19-óico produzido por *Helianthus annuus* (Hernandez-Terrones *et al.*, 2003) também inibem o PSII por competir pelo sítio de ligação da PQ.

O FUM somente apresentou resultados significativos em relação ao controle (p<0.05) quando comparado com os EAs (Fig. 5O), reduzindo a atividade do PSII em 38% na concentração 1,0 g.dm⁻³, revelando que a ação dessa substância ocorre mediante a sua baixa concentração nos bioensaios, como visualizado também no bioensaio pré-emergente (Fig. 1E-H e 2A-D) e em resultados anteriores (dados não mostrados). Esse fato pode estar relacionado à disponibilidade desse aleloquímico e à permeabilidade das células de *L. sativa* a essa substância, impossibilitando a sua ação em concentrações acima de 0,1 g.dm⁻³. Na maioria das vezes, essas substâncias podem afetar a permeabilidade da membrana e, em altas concentrações, inibir a absorção de água e nutrientes; em baixas concentrações pode facilitar a absorção desses (Einhellig, 2002).

Visto que o FUM apresentou influências na espécie-alvo, porém inferiores às obtidas pelos extratos EC 10 e 100 Gy e EA 100 Gy, é possível que a ação desse aleloquímico nesses extratos esteja sendo potencializada através de uma interação sinérgica com a ATR, como confirmado através de um significativo aumento na concentração FUM/ATR verificado na tabela 1. Einhellig e Rasmussen (1979)

argumentam que quantidades mínimas de fenóis individuais podem tornar-se relevantes quando sua atividade sinérgica for comprovada.

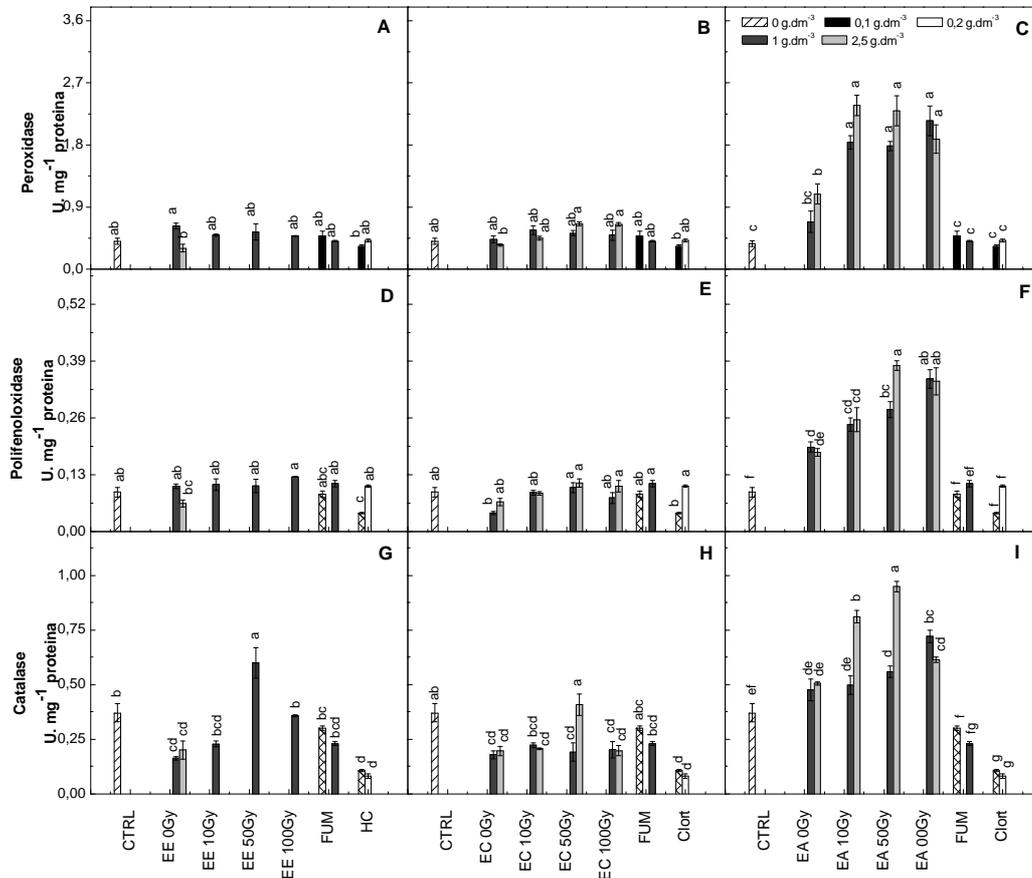


Figura 5. Valores médios da atividade de peroxidase (A-C), polifenoloxidase (D-F) e catalase (G-I) de folhas de *Lactuca sativa* germinadas previamente em água e depois transferidas para os diferentes extratos [EE: extrato etéreo (A, D e G), EC: extrato clorofórmico (B, E e H) e EA: extrato acetônico (C, F e I)] de *Cladonia verticillaris* irradiada com diferentes doses de radiação gama (doses de 0, 10, 50 e 100 Gy) nas concentrações de 1,0 e 2,5 g.dm⁻³, e ácido fumarprotocetrárico (FUM) nas concentrações de 0,1 e 1,0 g.dm⁻³, utilizando o herbicida clortoluron como controle positivo (HC) nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.dm⁻³ e água destilada como controle negativo (CTRL). As plântulas foram avaliadas 15 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05), médias ± SE, n = 3.

Outras fitotoxinas têm mecanismo de atuação semelhante no PSII (Weir *et al.*, 2004). Compostos como encecalina, euparina e dimetilencecalina extraídos das raízes de *Helianthella quinquenevris* (Castaneda *et al.*, 1996), crassifolin e o tephrobotin e glabranin de *Tephrosia spp.* (Céspedes *et al.*, 2001), além de monoterpenos de *Piqueria trinervia* (Anaya *et al.*, 1996) são inibidores do fluxo de elétrons da fotossíntese. Estudos com α -pineno revelam que essa substância perturba o metabolismo energético, agindo como um desacoplador da fosforilação oxidativa e da inibição da cadeia transportadora de elétrons (Abrahim *et al.*, 2003). Alguns aleloquímicos como benzopirano, lactonas, terpenos e fenilpropanoides são inibidores da reação de Hill (Lotina-Hennsen *et al.*, 1992). Entre os desacoplantes dos fotossistemas estão algumas fenilcumarinas e lactonas sequisterpênicas (King-Diaz *et al.*, 2001). Ácido lecanórico, barbático e girofórico também se comportam como desacopladores da cadeia transportadora de elétrons como observado nos cloroplastos isolados de tabaco e espinafre (Takahagi *et al.*, 2006). Ácido úsnico inibe a transpiração e fotólise da água de plântulas de milho e girassol, e sua atividade *in vitro* tem sido relatada como superior a outros inibidores sintéticos deste sítio-alvo (Legaz *et al.*, 2004; Latkowska *et al.*, 2006).

Os aleloquímicos estimulam a produção de EROs por diversos mecanismos. Dentre eles, o bloqueio da cadeia transportadora de elétrons, onde estes ficam livres e reagem facilmente com o O₂ formando superóxidos. Sorgoleona além de inibir a fotossíntese aumenta a produção de EROs que atuam no estresse oxidativo das membranas celulares (Gniazdowska e Bogatek, 2005). Portanto, as EROs podem atuar como mensageiros nas reações em cascata.

Normalmente, EROs são decompostas ou seus produtos de peroxidação são neutralizados pelos sistemas de defesas naturais constituídos por enzimas especializadas, mas o estresse aleloquímico pode inativar ou diminuir a atividade dessas enzimas, gerando um desequilíbrio no metabolismo das plântulas. Quando analisadas as atividades enzimáticas, observou-se que apenas os EAs influenciaram na atividade da POD (Fig. 5C) e PPO (Fig. 5F), incrementando essa ação com alteração aproximada de 170 a 492% para POD e de 125 a 362% para PPO, sendo essa variação dependente da dose de radiação/concentração. Contudo, o HC 0,1 g.dm⁻³ apresentou resultados

distintos aos extratos induzindo a redução de PPO (50%) quando comparado com as ações dos EEs (Fig. 5D), e não afetou a POD.

A atividade da POD é, frequentemente, aumentada em respostas aos estresses, sendo a proteção celular contra reações oxidativas uma das primeiras funções da enzima (Siegel 1993). Resultados semelhantes foram obtidos por Politycka *et al.* (2004) que observaram que a exposição das raízes de *Cucumis sativus* em ácido p-cumárico e ferúlico aumentava o nível de H₂O₂ e atividade da POD.

E, quase todos os extratos interferiram na atividade da CAT, sendo essa estimulada pelo EE 50 Gy 1,0 g.dm⁻³ (59,45% - Fig. 5G) e por todos os EAs irradiados (49 a 154% - Fig. 5I), e inibida pelo EE não irradiado (57%) e por todos os ECs (35 a 54%), com ações similares ao HC (78,5%), como visualizado nas figuras 5G-I. A ação dos compostos fenólicos nessas enzimas oxidativas está associada à interação antagônica e/ou sinérgica, variando seus efeitos de acordo com extrato/radiação/concentração, e não a um único aleloquímico, visto que o FUM não causou nenhuma alteração significativa nas plântulas-teste.

O aumento da CAT indica um aumento do sistema de defesa frente aos compostos fenólicos gerado pelo aumento da produção de EROs. A CAT é especialmente importante na remoção do H₂O₂ gerado nos peroxissomos (Gill e Tuteja, 2010), principalmente durante situações de estresse, onde há o aumento de EROs e proliferação dos peroxissomos na célula (Lopez-Huertas *et al.*, 2000). Nestas situações, uma população densa de peroxissomos torna-se importante para a detoxificação do H₂O₂, uma vez que EROs pode difundir livremente do citosol para dentro destas organelas, de forma que esta enzima torna-se importante não somente na detoxificação do peróxido produzido nos peroxissomos, mas também durante o aumento global desta molécula dentro da célula em situações de estresse (Mittler, 2002). Cruz-Ortega *et al.*, (2002) relataram que o extrato de *Callicarpa accuminata* aumentou o nível de radicais livres e a atividade da CAT de *L. esculentum*.

Altos níveis de enzimas antioxidantes foram encontrados em resposta ao estresse abiótico, podendo desempenhar um papel importante no mecanismo de aquisição de tolerância das plantas a diferentes situações de estresses ambientais (Mazorra *et al.*, 2002). O aumento da atividade enzimática em situações de estresse

pode ser resultado de uma alteração metabólica que conduz a um processo adaptativo (Vuleta e Šešlija, 2007). Monoterpenos têm sido relatados como indutores de estresses oxidativos pela produção de malondialdeído (Zunino e Zygodlo, 2004). Molnár e Farkas (2009), afirmam que os compostos liquênicos possuem uma forte atividade antioxidante e Hidalgo *et al.* (1994) relatam esta atividade atribuída a ATR, presente no EE, EC e EA.

Os resultados obtidos nos dois bioensaios apresentaram respostas distintas, sendo os parâmetros do pré-emergente influenciado principalmente pelos EEs, com concentração dos seus pigmentos fotossintéticos reduzidas e menor atividade da POD reduzidos e, PSII estimulado, e o pós-emergente alterado sobretudo pelos EAs, com aumento da concentração dos pigmentos fotossintéticos e das atividade das enzimas POD, PPO e CAT e redução da atividade do PSII. Esses resultados foram mais expressivos com os extratos de talos irradiados. Logo, o aumento das três atividades enzimáticas (Fig. 6C, 6F e 6I) frente a diminuição da atividade fotossintética no EA (Fig. 4O), pode ser uma possível estratégia de defesa das plântulas de *L. sativa* em condições de estresse. A concentração de Car não sofreu nenhuma alteração nessa análise comparativa.

Dessa forma, grande parte dos aleloquímicos atua no estresse oxidativo, produzindo EROs, que atuam diretamente ou como sinalizadores para os processos de degradação celular, impedindo assim a germinação e o desenvolvimento inicial, bem como processos fisiológicos vitais às plantas. Reigosa *et al.* (1999) descrevem que as diferentes respostas dos extratos ocorrem porque cada um desses processos tem respostas diferentes para determinadas doses de cada aleloquímico específico.

Inibidores do PSII têm sido, e continuarão sendo, ferramentas importantes para o controle de plantas daninhas na agricultura. No entanto, o surgimento contínuo de plantas daninhas resistentes aos inibidores comerciais do PSII é motivo de preocupação (Macias *et al.*, 2006). No entanto, pode ser possível desenvolver novas classes de herbicidas inibidores desse sítio, com dados obtidos nesta pesquisa que podem ajudar a resolver o problema de resistência a esses produtos. Em adição, o estudo dos aleloquímicos é um desafio frutífero para novas abordagens nas estratégias de controle de plantas daninhas.

Assim, diante dos resultados obtidos pode-se inferir que a radiação gama acelera uma resposta fisiológica em *C. verticillaris* como uma forma de defesa de um suprimento exógeno de fonte radioativa, induzindo uma maior produção de compostos fotoprotetores. Esses resultados corroboram com os obtidos por Rikkinen (1995) e por Lawrey (2009) que relatam que os compostos liquênicos possuem importante papel na proteção dos líquens contra o excesso de irradiação, protegendo as hifas do micobionte e as células das algas dos efeitos destrutivos da radiação. As taxas de acumulação desses compostos fotoprotetores se correlacionam com os níveis de radiação (Quilhot e Rubio, 2006). Sendo assim, o acúmulo desses compostos no talo liquênico pode ser liberado para o ambiente através do fenômeno da alelopatia, estimulando ou inibindo o crescimento dos vegetais ao seu redor. Técnicas de acoplamento como estas do uso da radiação gama com uma manipulação de condições do líquen proporcionam uma melhor compreensão da interação entre o estresse ambiental e a liberação de aleloquímicos. Deste modo, esses resultados além de colaborarem o conhecimento das interações ecofisiológicas da espécie, podem ser utilizados para prospecção de novos produtos naturais com finalidades fitorreguladoras ou bioherbicidas. Porém, devem-se isolar os aleloquímicos e desenvolver novos herbicidas biológicos capazes de controlar as culturas mediante seu uso, e este por sua vez, reduzir também o efeito negativo que os herbicidas químicos têm sobre a saúde das pessoas e meio ambiente.

AGRADECIMENTOS

R. C. Tigre e E. C. Pereira são gratos a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES, Brasil), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelos apoios e as bolsas de estudo e concedidos. Este trabalho foi financiado por uma doação do Ministério da Ciência e Inovação (Espanha), BFU2009-11983 para Profs. C. Vincent M. e E. Legaz.

REFERÊNCIAS

- Abraham, D.; Francisquini, A.C.; Pergo, E.M.; Bracht, A.M.; Ishii-Iwamoto, E.L. 2003. Effects of α -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry** **41**: 986-991.
- Achnine, L.; Mata, R.; Iglesias-Prieto, R.; Lotina-Hennsen, B. 1998. Impairment of photosystem II donor side by the natural Product odoratol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **46**: 5313-5317.
- Achnine, L.; Pereda-Miranda, R.; Iglesias-Prieto, R.; Moreno-Sanchez, R.; Lotina-Hennsen, B.; Tricolorin, A. 1999. A potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II acceptor side of spinach chloroplasts. **Physiologia Plantarum** **106**: 246-252.
- Alsaadawi, I.S.; Al-Rubeaa, A.J. 1985. Allelopathic effects of *Citrus aurantium* L. Vegetational patterning. **Journal Chemical Ecology** **11**: 1515-33.
- Anaya, A.L.; Hernández-Bautista, B.E.; Torres-Barragán, A.; León-Cantero, J.; Jiménez-Estrada, M. 1996. Phytotoxicity of cacalol and some derivatives obtained from the roots of *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob & Brettell (Asteraceae), “matarique” or “maturín”. **Journal Chemical Ecology** **22**: 393-403.
- Apel, K.; Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **The Annual Review of Plant Biology** **55**: 373-399.
- Asada, K. 1997. The role of ascorbate peroxidase and monodehydropascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. Pp. 715 -735. *In*: Scandolios, J.G. (Ed.). **Oxidative stress and the molecular biology of antioxidante defenses**. Cold Spring Harbor Laboratory Press Plainview.
- Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany** **91**: 179-194.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília. 399p.

- Cakmak, I.; Strbac, D.; Marschner, H. 1993. Activities of hydrogen peroxide scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal of Experimental Botany** **44**: 127-132.
- Castaneda, P.; Gomez, L.; Mata, R.; Lotina-Hennsen, B.; Anaya, A.L.; Bye, R. 1996. Phyto-growthinhibitory and antifungal constituents of *Helianthella quinquenervis*. **Journal of Natural Products** **59**: 323-326.
- Céspedes, C.L.; Achnine, L.; Lotina-Hennsen, B.; Salazar, J.R.; Gomez-Garibay. 2001. Inhibition of Photophosphorylation and electron transport by flavonoids and biflavonoids from endemic *Tephrosia* spp. of Mexico. **Pesticide Biochemistry and Physiology** **69**: 63-76.
- Cruz-Ortega, R.; Ayala-Cordero, G.; Anaya, AL. 2002. Allelochemical stress produced by the aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: effects on roots of bean, maize, and tomato. **Physiolgia Plantarum** **116**: 20-27.
- Czarnota, M.A; Paul, R.N; Dayan, F.A; Nimbal, C.I; Weston, L.A. 2001. Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: A potent PSII inhibitor in *Sorghum* spp. root exudates. **Weed Technology** **15**: 813-825.
- Del Rio, L.A; Corpas, F.J.; Sandalio, L.M.; Palma, J.M.; Gomez, M.; Barroso, J.B. 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal and Experimental Botany** **53**: 1255–1272.
- Einhellig, F.A.; Rasmussen, J.A. 1979. Effects of tree phenolics acids on chlorophyll content and growth of soybean and grain sorghum. **Journal of Chemical Ecology** **5**: 815-24.
- Einhellig, F.A. 1999. An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. Pp. 479-494. *In*: Inderjit, Dakshini KMM, Foy, CL. (Eds.). **Principles and practices in plant ecology allelochemical interactions**. CRC Press LLC, Boca Raton, USA.

- Einhellig, F.A. 2002. The physiology of allelochemicals action: clues and views. Pp. 1-23. *In*: Reigosa, MJ. And Pedrol, N. (Eds). **Allelopathy from molecules to ecosystems**, Science Publisher Inc. Enfield, NH.
- Einhellig, F. 2004. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. Pp. 217-238. *In*: Macías, F.A.; Galindo, J.C.G.; Molinillo, J.M.G.; Cutler, H.G. (Eds.). **Allelopathy. Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals**, CRC Press. Boca Raton.
- Gill, S.S.; Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry** **48**: 909-930.
- Gniazdowska, A.; Bogatek, R. 2005. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. **Acta Physiology Plantarum** **27** (3): 395-407.
- Gonzales, V.M.; Kazimir, J.; Nimbai, C.; Weston, L.A.; Cheniae GM. 1997. Inhibition of a photosystem II electron transfer reaction by the natural product sorgoleone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **45**: 1415-1421.
- Hernandez-Terrones, M.G.; Aguilar, M.I.; King-Diaz, B.; Lotina-Hennsen, B. 2003. Inhibition of photosystem II in spinach chloroplasts by trachyloban-19-oic acid. **Pesticide Biochem and Physiology** **77**: 12-17.
- Hidalgo, M.E.; Fernández, E.; Quilhot, W.; Lissi, E. 1994. Antioxidant activity of depsides and depsidones. **Phytochemistry** **37**: 1585-1587.
- Hyvärinen, M.; Walter, B.; Koopmann, R. 2002. Secondary metabolites in *Cladonia stellaris* in relation to reindeer grazing and thallus nutrient content. **Oikos**. **96**: 273–280.
- Kar, M., Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during leaf senescence. **Plant Physiology** **57**: 315-319.
- Khalaj, M.A.; Amiri, M.; Azimi, M.H. 2013. Allelopathy; physiological and sustainable agriculture impact aspects. **International Journal of Agronomy and Plant Production** **415**: 950 – 962.

- King-Diaz, B.; Esquivel, B.; Hernandez-Terrones, M.; Lotina-Hennsen, B. 2001. Metabolitos secundarios de plantas mexicanas como posibles agentes herbicidas. Pp. 111-132. *In*: Bernal-Lugo, I.; Loza-Tavera, H. (Ed.) 2001. **Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas**. Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Ciudad de Mexico.
- Kobayashi, K. 2004. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biology and Management** **4**: 1-7.
- Kranner, I.; Birtić, S. 2005. A modulating role for antioxidant in desiccation tolerance. **Integrative and Comparative Biology** **45**: 734-740.
- Lara-Nunez, A.; Sanchez-Nieto, S.; Anaya, A.L.; Cruz-Ortega, R. 2009. Phytotoxic effects of *Sicyos deppei* (Cucurbitaceae) in germinating tomato seeds. **Acta Physiologiae Plantarum** **136** (2): 180-192.
- Latkowska, E.; Lechowski, Z.; Bialczyk, J.; Pilarski, J. 2006. Photosynthesis and water relations in tomato plants cultivated long-term in media containing (-)-usnic acid. **Journal Chemical Ecology** **32**: 2053-2066.
- Lawrey, J.D. 2009. Lichen chemical defense. Pp. 167-181. *In*: White, J.; Torre, M. (Eds.) **Diversity of Defensive Mutualisms**. Taylor & Francis Group Publishers.
- Legaz, M.E.; Monso, M.A.; Vicente, C. 2004. Harmful effects of epiphytic lichens on trees. **Recent research development agronomy and horticulture** **1**: 1-10.
- Lopez-Huertas, E.; Charlton, W.L.; Johnson, B.; Graham, J.A.; Baker, A. 2000. Stress induces peroxisome biogenesis genes. **The Embo Journal** **19**: 6770-6777.
- Lotina-Hennsen, B.; King-Diaz, B.; Aguilar, M.I. Hernandez Terrones MG. 2006. **Plant secondary metabolites. Targets and mechanisms of allelopathy**. Springer Netherlands, ISBN: 978-1-4020-4279-9.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry** **193**: 265-275.

- Macías, F. A.; Marín, D.; Oliveros-Bastidas, A.; Castellano, D.; Simonet, A.M.; Molinillo, J.M.G. 2006. Structureactivity relationships (SAR) studies of benzoxazinones, their degradation products and analogues. Phytotoxicity on problematic weeds *Avena fatua* L. and *Lolium rigidum* Gaud. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **54**: 1040–1048.
- Mazorra, L. M.; Núñez, M; Hechevarría, M.; Coll, F.; Sánchez-Blanco, M.J. 2002. Influence of brassinosteroids on antioxidant enzymes activity in tomato under different temperaturas. **Biologia Plantarum** **45**: 593-596.
- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M.; Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Sciences** **9**: 490–498.
- Mobin, M.; Khan, N.A. 2006. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. **Journal of Plant Physiology** **164**: 601-610.
- Molnar, K.; Farkas, E. 2010. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. **Zeitschrift für Naturforschung** **65**: 157-173.
- Morales, F.F.; Aguilat, M.I.; Díaz, B.K.; de Santiago-Gómez, J.R.; Henssen, B.L. 2007. Natural diterpenes from *Croton ciliatoglanduliferus* as photosystem II and photosystem I inhibitors in spinach chloroplasts. **Photosynthesis Research** **91** (1): 71-80.
- Nelson; David, L.; Cox; Michael, M. 2005. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 4^a edição, W. H. Freeman. ISBN 978-0716743392.
- Pavithra, G.M.; Vinayaka, K.S.; Rakesh, K.N.; Junaid, S.; Dileep, N.; Kekuda, P.; Siddiqua, S.; Naik, A.S. 2013. Antimicrobial and antioxidant activities of a macrolichen *Usnea pictoides*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** **3**: 154-160.

- Peregrino, C.A.F. Leitão SG 2005. Chromatographical profiles of fluid extracts and tinctures obtained from *Mikania glomerata* Sprengel sterilized by gamma ray irradiation. **Revista Brasileira de Farmacognosia 15**: 237-242.
- Pereira, E. C. 1998. **Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae a partir de imobilização celular**. Recife, 240p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal de Pernambuco.
- Politycka, B.; Kozłowska, M.; Mielcarz B. 2004. Cell wall peroxidases in cucumber roots induced by phenolic allelochemicals. **Allelopathy Journal 13**: 29-36.
- Pompelli, M.F.; França, S.C.; Tigre, R.C.; Oliveira, M.T.; Sacilot, M.; Pereira, E.C. 2013. Spectrophotometric determinations of chloroplastidic pigments in acetone, ethanol and dimethylsulphoxide. **Brazilian Journal of Biosciences 11**: 52-58.
- Potty, V.H. 1969. Determination of proteins in the presence of phenols and pectins. **Analytical Biochemistry 29**: 535-539.
- Quilhot, W.; Rubio, C. 2006. Química de líquens antárticos. *In*: Xavier-Filho, L.; Legaz, M.E.; Cordoba, C.V.; Pereira, E.P. **Biologia de líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural.
- Reigosa, M.J.; Sanchez-Moreiras, A. 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences 18**: 877-608.
- Rice, E.L. **Allelopathy**. 1984. 2nd. Ed., Academic Press, Inc. London.
- Rikkinen, J. 1995. **What's behind the pretty colours? A study on the photobiology of lichens**. Bryobrothera, 4. Finnish Bryological Society, Editor: Timo Koponen, ISBN: 951-96475-3-8.
- Rimando, A.M.; Dayan, F.E.; Czarnota, M.A.; Weston, L.A.; Duke, S.O. 1998. A new photosystem II electron transfer inhibitor from *Sorghum bicolor* (L.). **Journal of Natural Products 61**: 927-930.

- Rizvi, S.J.H.; Tahir, M.; Rizvi, V.; Kohli, R.K.; Ansari, A. 1999. Allelopathic interaction Agroforestry systems. **Critical Reviews in Plant Sciences** **18**: 773-796.
- Romagni, J.G.; Rosell, R.C.; Nanayakkara, N.P.D.; Dayan, F.E. 2004. Allelopathy, chemistry and mode of action of allelochemicals. Pp 13-33. **Ecophysiology and potential modes of action for selected lichen secondary metabolites**. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Santiago, R.; de Armas, R.; Legaz, M.E.; Vicente, C. 2008. Separation from *Ustilago scitaminea* of different elicitors which modify the pattern of phenolic accumulation in sugarcane leaves. **Journal of Plant Pathology** **90** (1): 87-96.
- Siegel, B.Z. 1993. Plant peroxidases: An organismic perspective. **Plant Growth Regulator** **12**: 303-312.
- Silva, C.B. 2009. **Avaliação do potencial de atividade alelopática da parte aérea e subterrânea de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae)**. Dissertação de mestrado. Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
- Silva, H.P.B.; Colaço, W.; Pereira, E. C.; Silva, N. H.. 2010. Sensitivity of *Cladonia substellata* Vainio (lichen) to gamma irradiation and the consequent effect on limestone rocks. **International Journal of Low Radiation** **7** (4): 324-332.
- Silva, H.P.B. **Efeitos das radiações gama e ultravioleta sobre *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. (líquen) coletado em diferentes ambientes do Nordeste brasileiro**. 2011. 116f. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Singh, H.P.; Batish, D.R.; Kaur, S.; Ramezani, H.; Kohli, R.K. 2002. Comparative phytotoxicity of four monoterpenes against *Cassia occidentalis*. **Annals of Applied Biology** **14**: 111-116.
- Takahagi, T.; Ikezawa, N.; Endo, T.; Ifuku, K.; Yamamoto, Y.; Kinoshita, Y.; Takeshita, S.; Sato, F. 2006. Inhibition of PSII in atrazine-tolerant tobacco cells

by barbatic acid, a lichen-derived depside. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** **70** (1): 266-268.

Thipyapong, P.; Hunt, M.D.; Steffens, J.C. 2004. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta** **220**: 105–107.

Tigre, R.C., Silva, N.H., Santos, M.G., Honda, N.K., Falcão, E.P.S., Pereira, E.C., 2012. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology Environmental Safety** **84**: 125-132.

Trebst, A. 1972. Measurement of Hill reactions and photoreduction. Pp 146-165. In: San Pietro, A. (Ed.). **Methods in Enzymology**. “Photosynthesis and Nitrogen Fixation Part B”. Elsevier, Amsterdam.

Vuleta, A.; Šešlija, D. 2007. **World conference on stress**. Budapest, Hungary. Pp. 193.

Weir, T.L.; Sang-Wook, P.; Vivanco, J.M. 2004. Biological and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology** **7**: 472-479.

Yang, C.M.; Lee, C.N.; Zhou, C.H. 2002. Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*Oryza sativa*) seedlings: I. Inhibition of supply-orientation. **Botanical Bulletin of Academia Sinica** **43**: 299-304.

Yang, C.M.; Chang, I.F.; Lin, S.J.; Chou, C.H. 2004. Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*Oryza sativa*) seedlings: II. Stimulation of consumption-orientation. **Botanical Bulletin of Academia Sinica** **45**: 119-125.

Yu, J.Q.; Ye, S.F.; Zhang, M.F.; Hu, W.H. 2003. Effects of root exudates, aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus* L.) and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in Cucumber. **Biochemical Systematics and Ecology** **31**: 129-139

Zeng, R.S.; Luo, S.M.; Shi, Y.H.; Shi, M.B.; Tu, C.Y. 2001. Physiological and biochemical mechanism of allelopathy of secalonic acid F on higher plants. **Agronomy Journal** **93**: 72-79.

Zunino, M.P.; Zygodlo, J.A. 2004. Effect of monoterpenes on lipid oxidation in maize. **Planta** **219**: 303–309.

CAPÍTULO IV

Atividade Alelopática de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. pela Ativação da Urease

Será submetido a: **Acta Physiologiae Plantarum**

Atividade Alelopática de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. pela Ativação da Urease

R.C. Tigre^a, M.G. Santos^b, N.H. da Silva^c, C. Vicente^d, M.E. Legaz^d E.C. Pereira^{e*}

^a Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^b Departamento de Botânica, Laboratório de Ecofisiologia vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^c Departamento de Bioquímica, Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^d Grupo Comunicação Intercelular em Simbiose Vegetal, Faculdade de Biología; Universidade Complutense de Madrid, Av. José Antonio Novais, 12, CEP 28040, Madrid, Espanha

^e Departamento de Ciências Geográficas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP 50.740-901

*Autor correspondente: Fax: +55 81 2126 8275

E-mail addresses: biotigre@gmail.com (R.C. Tigre), mauroguida@yahoo.com.br (M.G. Santos), nhsilva@uol.com.br (N.H. Silva), cvicente@bio.ucm.es (C. Vicente), melegaz@bio.ucm.es (M.E. Legaz), Eugenia.pereira@pq.cnpr.br (E.C. Pereira)

RESUMO

O uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados tem gerado uma contínua degradação dos ecossistemas. Os líquens, um dos grupos mais sensíveis a poluição por nitrogênio, são capazes de capturar ureia presente nesses fertilizantes para ser hidrolisado pelo talo e fornecer esqueletos carbonados. Apesar do conhecimento da eficiência dos compostos liquênicos, as interações alelopáticas em ecossistemas não são ainda bem compreendidas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de ureia exógena no potencial alelopático de *Cladonia verticillaris* sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*. Talos foram utilizados nos bioensaios e, sobre eles foram borrifadas soluções de uréia nas concentrações 0,1; 1,0 ou 10,0 g.dm⁻³, utilizando água deionizada e ureia sem a presença dos talos liquênicos como controle. Observou-se que a água e ureia ativa a urease no líquen, sendo este efeito mais significativo quando utilizado líquen+água deionizada. Os talos incubados induziram uma hiperprodução dos ácidos fumarprotocetrárico e ácido protocetrárico, além da atranorina e substâncias intermediárias da biossíntese do primeiro, ocorrendo um decréscimo nesta concentração no decorrer do tempo. Constatou-se que o aumento desses aleloquímicos reflete no incremento do potencial alelopático e que a ureia aumenta a potencialidade das substâncias, principalmente a 0,1 g.dm⁻³. A concentração de 10 g.dm⁻³ foi tóxica ao líquen e às plântulas de *L. sativa*, interferindo no metabolismo de *C. verticillaris*. Portanto, constatou-se que a ureia é indispensável para o metabolismo liquênico, porém em altos níveis pode causar efeitos adversos a biota.

Palavras-chave: bioherbicida, ureia, substâncias liquênicas, ácido fumarprotocetrárico, ácido protocetrárico, atranorina

ABSTRACT

The indiscriminate use of nitrogen fertilizers has generated a continuing degradation of ecosystems. Lichens, one of the most sensitive to pollution by nitrogen groups, are able to capture urea present in these fertilizers to be hydrolyzed by the stem and provide carbonaceous skeletons. Despite the knowledge of the efficiency of liquênicos compounds, the allelopathic interactions in ecosystems are not well understood. Thus, the objective of this study was to evaluate the exogenous urea effect on allelopathic potential of *Cladonia verticillaris* on germination and early development of *Lactuca sativa*. Stalks were used in bioassays, and on them were sprayed urea solutions in concentrations of 0.1; 1.0 or 10.0 g.dm⁻³ using deionized water and without the presence of urea liquênicos as control stalks. We observed that the urea water and active urease in lichen, which is most significant effect when used lichen + deionized water. The stems incubated induced a hyperproduction of fumarprotocetrárico protocetrárico acids and acid addition and the atranorina Primiero intermediates of biosynthesis A decrease of this concentration occurring over time. It was found that these allelochemicals reflects the increase in the growth of allelopathic potential and urea increases the potential of substances, especially 0.1 g.dm⁻³. The concentration of 10 g.dm⁻³ was toxic to the lichen and *L. sativa* seedlings, interfering with *C. verticillaris* metabolism. Therefore, it was found that urea is essential for the metabolism liquênico, but at high levels can cause adverse effects to biota.

Palavras-chave: bioherbicide, urea, lichen substances, fumarprotocetraric acid, protocetraric acid, atranorin

1. INTRODUÇÃO

A demanda mundial por alimentos tem levado a uma corrida pelo aumento da produção e da produtividade agrícola, que incentiva uma crescente busca por fertilizantes. Diante disso, emissões antrópicas de nitrogênio reativo (Nr) tornaram-se as fontes dominantes de deposição de nitrogênio (N) em muitos ecossistemas (Galloway *et al.*, 2008; Bobbink *et al.*, 2010; Howarth, 2011), alterando seu ciclo global, devido à intensificação da atividade agrícola, aumento do consumo de combustíveis fósseis, o cultivo de leguminosas fixadoras de nitrogênio e outras ações (Galloway *et al.*, 2004; 2008). Apesar do N ser um nutriente essencial para os vegetais, a entrada excessiva de Nr nos ecossistemas terrestres pode causar muitos riscos ecológicos (Matson *et al.*, 2002), como eutrofização regional, acidificação e diminuição da diversidade vegetal e liquênica (Brown, 1992; Gao *et al.*, 2007). Um forte exemplo dessa degradação de ecossistemas é o bioma da Mata Atlântica no Nordeste do Brasil.

A ureia é um elemento que possui grande quantidade de nitrogênio na sua composição e tem sido amplamente utilizada na fertilização de culturas comerciais. Além de ter maior teor de nitrogênio em relação a outros produtos, ela possui menor poder acidificante do solo e elevado potencial de perdas pelo processo de volatilização da amônia (NH₃) (Marchesan *et al.*, 2011), sendo considerada a fonte de nitrogênio mais tóxica (Trivelin, 2002).

Os líquens alimentam-se basicamente de forma higroscópica dependendo dos nutrientes procedentes do meio para o seu metabolismo e desenvolvimento, fixando elementos do ar (Guzman *et al.*, 1984; Nash III, 2008;). Dessa forma, muitas espécies desses organismos simbiontes são capazes de capturar ureia diretamente para ser hidrolisado pelo talo (Hugron *et al.*, 2013) e podem armazená-la para utilização quando o substrato não fornece elementos nitrogenados suficientes para as necessidades metabólicas (Vicente, 1975). Este conceito é baseado pela observação de que alguns líquens secretam enzimas extracelulares que agem de acordo com componentes nitrogenados desses substratos (Moisejeva, 1961). O suprimento exógeno de ureia ocasiona uma hidrólise enzimática capaz de produzir CO₂ e amônia que, respectivamente, aceleram a fotossíntese da alga e favorecem a síntese dos aminoácidos (Syrett, 1962), que são usados para sintetizar fenóis (Blanco *et al.*, 1984). Assim, nutrientes do solo, quando volatilizados, influenciam o metabolismo liquênico, promovendo uma maior síntese de metabólitos bioativos, que quando percolados para o solo, influem sobre a biota microbiana modificando características do solo como pH e, disponibilidade de nutrientes (Vasconcelos, 2007).

Cladonia verticillaris, líquen endêmico, presente em ecossistemas de Tabuleiros Costeiros, participa da ciclagem de nutrientes, tanto pela liberação de suas substâncias, como por absorver substâncias do meio ambiente (Vasconcelos, 2013), sendo capazes de sintetizar urease por indução nutricional (Vicente e Xavier Filho, 1979). Seus compostos têm sido estudados como inibidores e reguladores do crescimento vegetal (Tigre *et al.*, 2012), sendo potentes aleloquímicos que regulam o aumento e redução da atividade de enzimas oxidativas. Diante disso, acredita-se que o suprimento exógeno de ureia possa aumentar a potencialidade alelopática dessa espécie e que o estudo do aporte de N em *C. verticillaris* possa favorecer o entendimento da relação desse líquen em seu ecossistema.

Buscando elucidar o aporte de N no metabolismo dos líquens, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de ureia exógena no potencial alelopático de *Cladonia verticillaris* sobre a germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Cladonia verticillaris, espécie endêmica do litoral brasileiro e de tabuleiros do interior do nordeste, foi coletada na Serra da Prata no município de Saloá (PE), e acondicionada em caixas de papel e mantida à temperatura ambiente ($28^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$), até a realização dos experimentos. O material foi identificado e sua exsiccata depositada no herbário UFP - Geraldo Mariz, pertencente ao Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), com registro 52.299. Sementes de *Lactuca sativa* var. Grand Rapids L. foram adquiridas comercialmente da Isla Pak, Porto Alegre, Brasil.

2.2 Bioensaio de germinação (Pré-emergente)

O experimento foi conduzido em placas de Petri esterilizadas de 9 cm de diâmetro, forradas com duas folhas de papel de filtro previamente autoclavadas. Os papéis de filtro foram umedecidos com 5 mL de soluções de ureia. Também foram utilizados vasos plásticos de 9 cm de diâmetro e 10 cm de altura, forrados com duas folhas de papel-filtro. Nestes foram colocados 3,5 g dos talos de *C. verticillaris* que receberam borrifos de aproximadamente 10 mL de soluções de ureia, em dias alternados. Foram semeados em cada placa e em cada vaso 50 aquênios de *L. sativa* por repetição, e três repetições por tratamento, dispostos em delineamento inteiramente casualizado. As concentrações de ureia utilizadas foram 0,1; 1,0 e $10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, e o controle foi estabelecido por água deionizada. O experimento foi conduzido em câmara de germinação com temperatura de $22^{\circ}\text{C}\pm 0,2$, fotoperíodo de 12 h e umidade relativa de 75%.

A porcentagem de germinação foi monitorada realizando contagens diárias de germinações por um período de 10 dias, sendo considerados germinados os aquênios

que apresentaram protusão radicular igual ou maior que 2 mm (Brasil, 2009). Após esse período, o desenvolvimento das plântulas foi avaliado através de parâmetros biométricos descritos por Benicasa (1988). A biomassa seca total foi determinada pelo peso em miligramas das plântulas que foram mantidas em estufa a 80°C durante 48 h até a estabilização do peso. A germinabilidade total e o tempo médio de germinação (TM) foram avaliados segundo a metodologia de Laboriau (1983) e a biometria segundo especificações de Benicasa (1988). Para a obtenção dos parâmetros biométricos foram utilizadas medidas do comprimento do hipocótilo e da radícula, largura e área foliar. Também foram analisadas as alterações morfológicas como ausência de pelos e/ou necrose radicular. As plântulas foram classificadas em normais ou anormais, de acordo com as especificações de Brasil (2009).

2.3 Bioensaio de crescimento (Pós-emergente)

A montagem desse bioensaio foi realizada semelhante ao de germinação, contudo foram utilizados em cada placa/vaso dez aquênios previamente germinados por 48h. As avaliações para análise de crescimento foram realizadas no décimo dia.

2.4 Análise físico-química

Foram realizadas medidas de pH das soluções de ureia antes e depois dos bioensaios.

2.5 Separação e quantificação dos aleloquímicos de *Cladonia verticillaris*

O principal componente da espécie em estudo, ácido fumarprotocetrárico (FUM), foi isolado e purificado a partir do extrato acetônico de *C. verticillaris*. Este, após concentrado, foi lavado em funil poroso G-4 com acetona, como descrito por Pereira (1998). O ácido protocetrárico (PRO) foi extraído do líquen *Parmotrema dilatatum* (Vain.) Hale, utilizando diclorometano, seguido por acetona à temperatura de aproximadamente 45°C, como descrito por Tigre *et al.* (2012). A atranorina (ATR) foi obtida comercialmente da Sigma Química LTDA, Brasil.

2.6 Teste de viabilidade do talo liquênico

Ao término dos bioensaios, os talos liquênicos foram submetidos a extração com éter/acetato de etila (65:35) e clorofórmio/acetonitrila (60:40) segundo metodologia de Pereira *et al.* (1995). As extrações foram realizadas para identificação da viabilidade do talo através da liberação das substâncias. Os exsudatos tiveram suas frações aquosas e fenólicas separadas através da técnica desenvolvida por Pereira *et al.* (1995). As frações fenólicas foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD). Essa foi realizada em placas de sílica Gel F₂₅₄₊₃₆₆ Merck, posteriormente desenvolvidas no sistema de solventes B (hexano/ éter dietílico/ ácido fórmico, 130:80:20, v/v) (Culberson, 1972). Após evaporação dos solventes as placas foram reveladas sob luz UV curta e longa, e posteriormente pulverizadas com ácido sulfúrico a 10% e aquecidas. Os *spots* visualizados foram identificados pela comparação do índice de retenção (Rf) com aqueles obtidos para as substâncias padrão: ácido fumarprotocetrárico (FUM), ácido protocetrárico (PRO) e atranorina (ATR).

2.7 Quantificação de Ureia

Durante os bioensaios (terceiro, sexto e nono dia) foi determinada a concentração de ureia no talo e no líquido por ele lixiviado.

2.7.1 Talo liquênico

A preparação do extrato consistiu na utilização de 100 mg do talo liquênico, macerado a seco e a frio em nitrogênio líquido e homogeneizados com 4 mL de água destilada. Este homogenato foi centrifugado a 11.000 x g durante 10 min. a 4°C. No sobrenadante foi determinada a concentração de ureia pelo método de Rahmatullah *et al.* (1980), com modificações. Para isto, foram utilizados 0,25 mL desse extrato e adicionados 1,5 mL do reativo DAM (reativo 1 (R1) - 600 mg de diacetilmonoxima reagidos com 30 mg de thiosemicarbazide dissolvidos em água até 100 mL; reativo 2 (R2) - 7 mL de ácido fosfórico em 16 mL de ácido sulfúrico reagidos em água até 100 mL) na proporção 1:2 (R1:R2). As amostras foram levadas a banho-maria a 100°C por 10 min. e realizadas leituras a 525 nm em espectrofotômetro Unicam Heλios β (Thermo Fisher Sci.Inc., Rockford, IL, USA), o branco consistiu em 1mL de água em 1,5 do reativo DAM (v/v).

2.7.2 Líquido lixiviado do talo

A amostra foi preparada utilizando-se 0,1 mL do lixiviado em 5 mL de água destilada. Dessa mistura foram utilizadas alíquotas de 1 mL para reagir com 1,5 mL do reativo DAM. Posteriormente a amostra foi submetida a banho-maria por 10 min. e realizadas leituras a 525 nm, conforme item anterior.

2.8 Quantificação dos compostos fenólicos

A extração do talo liquênico foi realizada com 100 mg de material em 2 mL de água destilada por 3 h em agitação. Posteriormente o extrato foi filtrado e concentrado. A partir desse concentrado foram preparadas soluções que foram submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para separação e quantificação dos compostos fenólicos.

O mesmo foi realizado para o lixiviado, porém o procedimento consistiu em recolher alíquotas de 1 mL do lixiviado, que foi concentrada e realizada a separação e quantificação das substâncias em CLAE.

A separação e quantificação dos aleloquímicos majoritários foi realizada por RP-HPLC em um cromatógrafo líquido usando Spectra Physics 8810 (Thermo Electron Corporation, Asheville, NC, USA), equipado com uma bomba SP 8810, um injetor Rheodine, um detector UV-Visível SP8490 e o programa DateApex Clarity Lite™ para Windows (DateApex Ltda., Praha, Czech Republic) para obtenção e integração dos dados. Os concentrados foram dissolvidos em fase móvel antes de serem injetados. As condições de análises foram: Coluna de fase reversa (RP), Mediterranea Sea C18 de Teknokroma, S.C.L., Espanha; dp 5 µm, L, 120 mm; d.i. 4,6 mm; pressão em coluna, 70 bar. Fase móvel [acetonitrila]:[acetonitrila: ácido acético a 4% em água Mili-Q (80:20, v/v)] [70:30, v/v], isocrática a 1 mL·min⁻¹. Volume de injeção: 10 µL. Temperatura 22°C±0,1°C. Comprimento de onda: 254 nm. Taxa de detecção: 0,0005 unidades (Santiago *et al.*, 2008). A quantificação de ATR, FUM e PRO se realizou por meio da interpolação da resposta do detector, em contas de área e na correspondente reta de calibração. Esta foi construída com cada aleloquímico, calculando a reação entre a conta de área obtida a partir de concentrações crescentes de

cada composto (entre 290 e 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para FUM, 10-500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para PRO e 30-400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para ATR).

2.9 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso com três repetições. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e quando detectadas diferenças foram analisadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSAO

3.1 Bioensaio de Germinação (Pré-Emergente)

A germinabilidade total dos aquênios de *L. sativa* foi influenciada apenas por *C. verticillaris* submetida a ureia 10,0 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$, que reduziu esse parâmetro em até 34,05% (Fig. 1A) em relação ao controle ($p < 0.05$). O vigor dessas também foi reduzido apenas por ureia 10,0 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ (101,97%), porém sem a presença do líquen (Fig. 1B). Esses resultados demonstram que a concentração 10,0 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ influi negativamente sobre as plântulas de *L. sativa*, sendo decorrente do efeito tóxico da ureia e não um efeito alelopático. Para Ferreira e Áquila (2000), o efeito alelopático pode não ocorrer sobre o percentual final de germinação no tempo, mas ocorrer sobre a velocidade de germinação e provocar alterações na curva de distribuição da germinação, alongando-a através do eixo do tempo. Segundo Bewley & Black (1978) e Labouriau (1983), alterações nas curvas de germinação indicam interferências nas reações metabólicas que culminam na germinação.

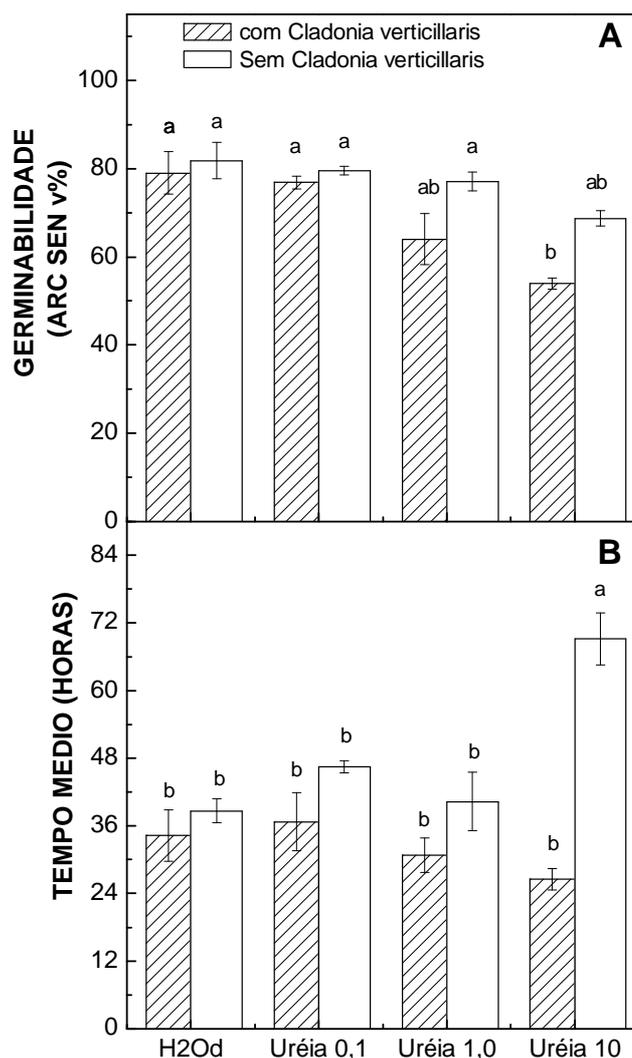


Figura 1. Valores médios da germinabilidade total (A), e do tempo médio de germinação, 180 h (B) de aquênios de *Lactuca sativa* submetidas a ação de *Cladonia verticillaris* e suprimento exógeno de ureia nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 g.dm⁻³, utilizando como controle o líquen borrifado com água, ou e ureia nas mesmas concentrações sem a presença de *C. verticillaris*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05), médias ± SE, n = 3.

Quanto aos parâmetros biométricos, evidenciou-se que a área foliar (Fig. 2A) foi estimulada quando tratada apenas com ureia 0,1 g.dm⁻³ e inibida na presença do líquen com água e ureia 0,1 e 1,0 g.dm⁻³. O crescimento hipocotilar (Fig. 2B) foi significativamente estimulado pelos talos liquênicos quando recebiam apenas água destilada durante a realização do bioensaio. Este mesmo tratamento também induziu

aumentos no comprimento radicular (Fig. 2C), juntamente com o líquen na presença de ureia $0,1 \text{ g.dm}^{-3}$, e ureia $1,0 \text{ g.dm}^{-3}$ com ou sem *C. verticillaris*. Notou-se que no bioensaio sem a presença do talo liquênico ocorreram reduções do eixo hipocótilo-radícula à medida que se aumentava a concentração de ureia, sendo a concentração $10,0 \text{ g.dm}^{-3}$ letal as plântulas de *L. sativa*, tanto na presença do líquen quanto na sua ausência, podendo interferir até mesmo no metabolismo liquênico, destruindo suas células, uma vez que neste tratamento os talos apresentaram-se bastante escuros (oxidados) e amolecidos (Fig 3D). Observou-se também que o talo liquênico sem ureia exógena estimulava o comprimento do hipocótilo em 53,31% com relação ao controle sem o talo. O comprimento radicular foi estimulado significativamente pela presença liquênica com adição de água deionizada e ureia $0,1 \text{ g.dm}^{-3}$ (Fig. 2C), sendo este efeito mais expressivo pela adição de água que aumentou em 121,94% o comprimento, caracterizado como efeito alelopático positivo. Segundo Blanco *et al.* (1984) e Pereira *et al.* (1986), este resultado é explicado porque o micobionte possui ureia endógena que é ativada quando o talo liquênico é imerso em água. Segundo Lima *et al.* (1990), as altas médias no comprimento de plântulas provavelmente são decorrentes do aumento da divisão celular.

Na figura 2B pode-se notar que a presença do líquen favorece a sobrevivência das plântulas (Fig. 3B) mesmo quando a concentração de ureia apresenta-se em concentrações de toxicidade (até a concentração $1,0 \text{ g.dm}^{-3}$, acima dessa concentração a ureia compromete o desenvolvimento tanto das plântulas quanto do líquen). A concentração de ureia $1,0 \text{ g.dm}^{-3}$ sem a presença do líquen causa a mortalidade das plântulas de *L. sativa* (Tab. 1 e Fig. 3H). Pesquisas anteriores realizadas por Oliveira (1991) evidenciaram que concentrações de $5,0$ e 10 g.dm^{-3} de ureia sobre talos de *Cladina dendroides* acarretava altas taxas de inibição de *L. sativa*. Segundo Legaz *et al.* (2006) todas as substâncias têm efeitos tóxicos quando as concentrações no talo liquênico superam os níveis tolerados. Adição de amônia exógena redundava em uma acumulação massiva de glutamina. A amônia pode inibir por si mesma a atividade nitrogenase quando se acumula em grandes quantidades, dado que uma glutamato desidrogenase fúngica utiliza eficientemente ureia na síntese de glutamato (produto primário de assimilação do nitrogênio). Nesse sentido se deve supor que a necessidade de esqueletos carbonados para assimilação da amônia produzida por redução de

nitrogênio vem suplementada pelos fotossintatos e seus produtos de degradação oxidativa (Legaz *et al.*, 2006).

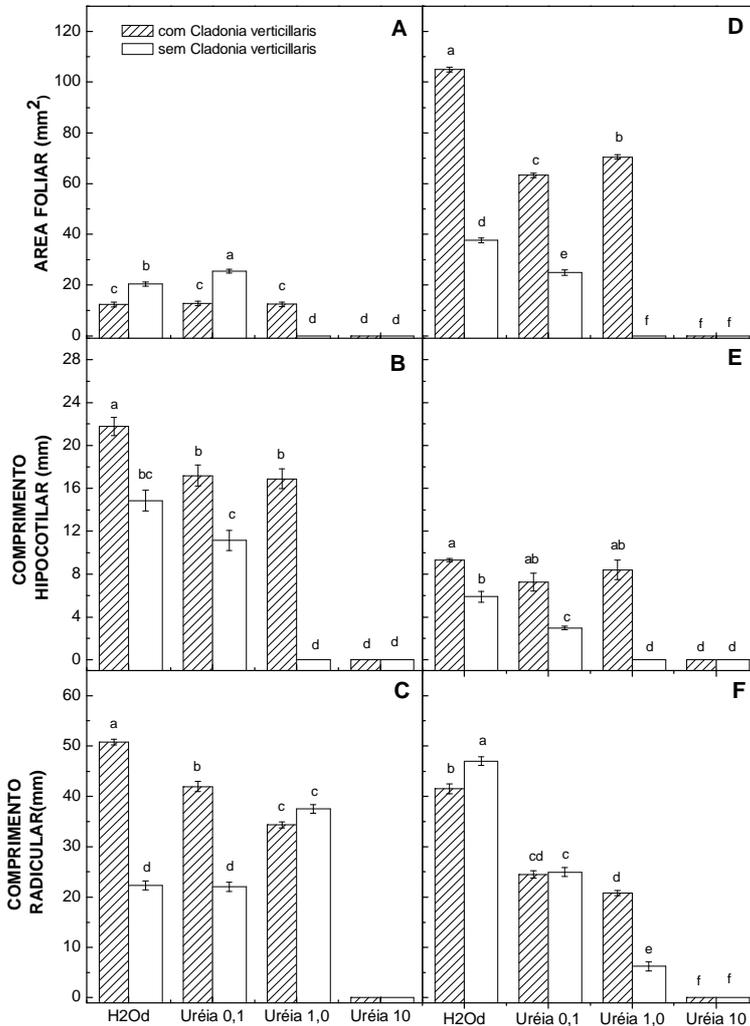


Figura 2. Valores médios da área foliar (**A, D**), do comprimento hipocotilar (**B, E**) e do comprimento radicular (**C, F**) de plântulas de *Lactuca sativa* germinadas (**A-C**) ou transferidas após germinação em água submetidas (**D-F**) a ação de *Cladonia verticillaris* e suprimento exógeno de ureia nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 g.dm⁻³, utilizando água destilada como controle ou ureia nas mesmas concentrações sem a presença de *C. verticillaris*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), médias \pm SE, $n = 3$.

Estudos de Iskandar e Syers (1971) mostraram que depsídeos e depsidonas possuem baixa hidrossolubilidade. Contudo, pesquisas realizadas por Xavier-Filho *et al.* (1985) demonstraram que após prolongados dias de chuva encontravam-se quantidades significativas de FUM no solo. Esse fato é justificado por Ascaso e Galvan (1976) que afirmam que esse fenol constitui umas das substâncias liquênicas mais solúveis em água. As unidades fenólicas mais hidrossolúveis a partir das quais esse composto é formado podem ocorrer em líquens sob condições de campo (Iskandar e Syers, 1973). É possível, pela capacidade quelante das substâncias liquênicas, que estas formem complexos com íons de compostos do solo, modificando, dessa forma a polaridade e, conseqüentemente, sua solubilidade. Como o FUM é uma depsidona presente em grandes quantidades em *C. verticillaris*, esperava-se que os efeitos observados na Figura 1A-C estivessem relacionados aos mecanismos de ação deste composto. Porém foram encontrados maiores concentrações de PRO e ATR tanto no talo (Tab. 2) quanto no lixiviado (Tab. 3) que variaram em função do tempo e da concentração de ureia. É possível que este resultado seja uma resposta a ativação da ureia que tem gerado a produção de substâncias intermediárias como PRO e ATR para a síntese de FUM (Pereira *et al.*, 1999). O aumento dessa produção é nítido na Tabela 2, onde foi evidenciado um aumento da concentração de PRO no talo de *C. verticillaris* quando submetida a ureia $1,0 \text{ g.dm}^{-3}$. O sistema enzimático responsável pela fixação de nitrogênio é uma nitrogenase, em geral muito mais ativa na parte mais central do talo que nas zonas apicais e basais (Legaz *et al.*, 2006), podendo dessa forma este elemento estar agindo no metabolismo do FUM que encontra-se na região medular de *C. verticillaris*.

De acordo com a tabela 3 pode-se inferir que os efeitos alelopáticos observados na Figura 1A-C sejam resultantes de uma ação sinérgica ou antagônica dos aleloquímicos, diferindo a intensidade de sua ação mediante a concentração das substâncias presentes no meio. Einhellig e Rasmussen (1979) expõem que a quantidade aparentemente insignificante dos fenóis individualmente chega a ser relevante quando demonstram sua atividade sinérgica.



Figura 3. Experimento com *Cladonia verticillaris* com e sem adição de ureia. **B e H.** experimento pré-emergente. **C-G.** Experimento pós-emergente. **A.** Extração do líquen para teste de vitalidade após a instalação do experimento. **B.** Plântulas submetidas ao tratamento com líquen+H₂O_d, **C.** Plântulas tratadas com líquen+ureia 0,1 mg.mL⁻¹, **D.** Plântulas tratadas com líquen+ureia 10 mg.mL⁻¹, **E.** Plântulas tratadas com líquen+ureia 1,0 mg.mL⁻¹, **F.** Plântulas tratadas com ureia 1,0 mg.mL⁻¹, **G.** Plântulas tratadas com ureia 10,0 mg.mL⁻¹. **H.** Plântulas com ureia 1,0 mg.mL⁻¹.

Tabela 1. Avaliação das plântulas quanto à fitotoxicidade de *Cladonia verticillaris* sob *Lactuca sativa* quando submetidas a água deionizada e doses crescentes de ureia (0,1; 1,0 e 10,0 g.dm⁻³), mais o controle (0%).

Concentrações de Ureia (mg.mL ⁻¹)	PRÉ-EMERGENTE		PÓS-EMERGENTE	
	Com Líquen	Sem Líquen	Com Líquen	Sem Líquen
0,0	Normal	Normal	Normal	Normal
0,1	Normal*	Normal	Anormal	Normal*
1,0	Anormal	Anormal**	Anormal	Anormal**
10	Anormal**	Anormal**	Anormal**	Anormal**

*Com pequenos defeitos; ** Algumas plântulas mortas

As plântulas com líquen e ureia a 1,0 g.dm⁻³ foram caracterizadas como anormais (Tab. 1), com algumas necroses no ápice radicular (Fig. 4E-F). Todavia este resultado pode ser um efeito aditivo da substância líquênica com a elevada dose de ureia, uma vez que sem o talo as plântulas apresentavam-se mortas. A ureia a 0,1 g.dm⁻³, sem a presença do talo líquênico (Fig. 4G), induz a formação de pelos e raízes laterais pequenas e, ao aumento no diâmetro das radículas, demonstrando que a ureia altera o metabolismo hormonal das plântulas. A adição dessa solução em *C. verticillaris* também levou à formação de pequenas raízes laterais em *L. sativa*, podendo dessa forma, sugerir que este efeito é relacionado à adição de ureia e não a presença do líquen. Aloni *et al.* (2006), relataram que a deficiência de citonina e altos níveis de auxina levam a formação precoce de raízes laterais. Segundo Pina (2008), baixos níveis de etileno/auxina são inibidores de formação de raízes laterais e, portanto, sua presença se torna importante no processo de ramificações nas raízes. Alterações na formação de pelos, no tamanho radicular e presença de raízes laterais também foram observadas por Oliveira (2004), Jerônimo (2006) e Pina (2008).

Os aleloquímicos atuam por diferentes mecanismos nas espécies receptoras, podendo agir como fitorreguladores (Tigre *et al.*, 2012). Yano (1994) notou que dependendo da concentração os extratos de *C. verticillaris* promoviam o crescimento radicular e hipocotilar de *Allium cepa*. Essas diferenças no grau de inibição ou estímulo de um aleloquímico dependem da espécie estudada, do tempo de exposição dos compostos e de sua concentração (Bradow *et al.*, 1991).

Tabela 2. Quantificação dos compostos fenólicos do lixiviado de *Cladonia verticillaris*, submetida a ureia exógena (0; 0,1; 1,0 e 10,0 g.dm⁻³), no terceiro, sexto e nono dia do experimento.

TEMPO	TRATAMENTOS (g.dm ⁻³)	PRO	FUM	ATR	FUM/ PRO	FUM/ ATR	PRO/ ATR	FUM+PRO +ATR	SNI** 1	SNI 2	SIN 3
		(µg.mL ⁻¹)	(ca)***	(ca)	(ca)						
		t _R ≈ 6,6	t _R ≈ 7,8	t _R ≈ 27,8					t _R ≈ 8,58	t _R ≈ 9,36	t _R ≈ 10,22
3ª dia	ÁGUA	109,10	28,20	25,48	0,25	1,10	4,28	137,31	3064,93	18846,64	25238,97
	UREIA 0,1	43,63	32,241	-	0,73	0	0	127,91	-	10575,42	12180,19
	Ureia 1,0	76,24	13,03	52,03	0,17	0,25	1,46	89,276	22795,63	51320,55	-
	Ureia 10,0	86,697	29,47	0	0,339	0	0	116,17	-	50369,21	-
6ª dia	ÁGUA	35,34	15,13	-	0,42	0	0	50,48	15143,92	23177,49	1504,5
	UREIA 0,1	45,04	31,87	-	0,70	0	0	76,92	-	54063,59	-
	Ureia 1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ureia 10,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9ª dia	ÁGUA	0,89	1,25	0,3	1,39	4,11	2,94	2,37	-	707,98	21,36
	UREIA 0,1	0,86	1,57	0,21	1,81	7,23	3,98	2,44	-	390,05	0,5
	Ureia 1,0	-	1,69	-	-	-	-	-	-	854,44	27,06
	Ureia 10,0	-	-	0,30	-	-	-	-	114,94	180,53	-

*t_R: tempo de retenção; ** SNI: Substância não identificada; ***c.a: contas de área

Tabela 3. Quantificação dos compostos fenólicos dos extratos do talo de *Cladonia verticillaris*, submetida a ureia exógena (0; 0,1; 1,0 e 10,0 g.dm⁻³), no terceiro, sexto e nono dia do experimento.

TEMPO	TRATAMENTOS (g.dm ⁻³)	PRO	FUM	ATR	FUM/ PRO	FUM/ ATR	PRO/ ATR	FUM+PRO +ATR	SNI** 1	SNI 2	SNI 3
		(µg.mL ⁻¹)	(ca)***	(ca)							
		t _R ≈ 6,6	t _R ≈ 7,8	t _R ≈ 27,8					t _R ≈ 8,58	t _R ≈ 9,36	t _R ≈ 10,22
0	ÁGUA	0,91	1,10	0,53	0,57	1,97	2,26	2,13	211,74	-	17,79
3ª dia	ÁGUA	70,11	13,85	-	0,19	0	0	133,35	18280,54	55925,39	-
	UREIA 0,1	0	26,48	49,39	0	0,53	0	90,97	21613,15	36318,02	12681,06
	Ureia 1,0	93,40	35,20	64,48	0,37	0,54	1,44	128,61	-	42145,82	-
	Ureia 10,0	204,01	0	0	0	0	0	204,01	-	56703,81	-
6ª dia	ÁGUA	0,66	14,61	0	21,99	0	0	56,24	21419,42	55183,04	-
	UREIA 0,1	33,14	28,23	40,96	0,85	0	0	80,82	-	34471,72	14609,9
	Ureia 1,0	-	15,46	19,44	0	0	0	15,46	14111,64	23521,9	18719
	Ureia 10,0	-	-	-	-	-	-	-	24303,33	52648,99	-
9ª dia	ÁGUA	1,22	1,38	0,09	1,13	14,97	13,24	2,68	646,68	239,58	6,17
	UREIA 0,1	0,72	1,33	0,07	1,84	17,44	9,43	2,06	59,15	125,92	-
	Ureia 1,0	107,93	-	-	-	-	-	108,51	39103,8	-	53033,1
	Ureia 10,0	0,66	1,53	1,53	2,3	2,66	1,15	2,19	571,51	135,41	-

*t_R: tempo de retenção; ** SNI: Substância não identificada; ***c.a: contas de área

3.2 Bioensaio de Crescimento (Pós-Emergente)

Neste bioensaio observou-se que com exceção da ureia 10,0 g.dm⁻³, todos os tratamentos com *C. verticillaris* induziram significativamente o aumento da área foliar, cuja intensidade variou em função da concentração de ureia, sendo os resultados mais expressivos obtidos por líquen+água deionizada que aumentou este parâmetro em até 175,45% em relação ao controle sem o líquen. Experimentos com ureia 0,1 e 1,0 g.dm⁻³ inibiram a área foliar, demonstrando que este composto não inibe a produção de compostos alelopáticos em *C. verticillaris*.

O crescimento hipocotilar (Fig. 2E) apresentou interações significativas ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo reduzido pela ureia 0,1 g.dm⁻³ sem a presença do líquen em 49,40% e foi estimulado pelo líquen+água deionizada em 57,72%. A baixa alcalinização da água aumenta a solubilidade de compostos fenólicos, principalmente o FUM que são translocados da medula para o córtex promovendo uma maior síntese de compostos bioativos que podem influir sobre a biota adjacente (Silva, 2007).

O crescimento radicular também foi alterado, sendo inibido por todos os tratamentos com ureia, com exceção do tratamento com ureia 10,0 g.dm⁻³, na presença e ausência do líquen, que causaram a mortalidade das plântulas (Fig. 2F). Para Legaz *et al.* (2006) esses nutrientes exercem grande importância no metabolismo liquênico e devem existir em limites precisos na estrutura interna do talo, podendo se tornar tóxicos quando superados os limites tolerados. O efeito mais severo sobre a área foliar foi observado pela ureia 1,0 g.dm⁻³ que inibiu esse parâmetro em 87,58% em relação ao controle. Todavia, além de inibição dos parâmetros biométricos, mudanças estruturais em algumas organelas, na membrana plasmática e na parede celular podem ocorrer por respostas a aleloquímicos (Cruz-Ortega, 1998). As respostas fisiológicas e morfológicas das plântulas à exposição a esses compostos são manifestações secundárias decorrentes de alterações moleculares e celulares, cujos mecanismos ainda permanecem obscuros (Rizvi *et al.*, 1992; Ferreira e Áquila, 2000).

À medida que se aumentava a concentração de ureia, ocorria diminuição do eixo hipocótilo-radícula, obedecendo ao modelo dose-redução. A concentração de 1,0 g.dm⁻³ mostra que a espécie liquênica absorve muito bem a ureia, interferindo na liberação e ação dos aleloquímicos, uma vez que sem a presença de *C. verticillaris* a ureia

ocasionou a morte das plântulas. Segundo Legaz *et al.* (2006) a ureia é indispensável para o líquen, pois fornece CO₂ para a fotossíntese da alga e amônia para a síntese de novos aminoácidos, mas em quantidades adequadas às reações.



Figura 4. Sinais de toxicidade sobre plântulas de *Lactuca sativa* submetidas aos talos de *Cladonia verticillaris* com e sem adição de ureia, comparadas ao controle (H₂O_d). **A-D.** Bioensaio pré-emergente. **E-G.** Bioensaio pós-emergente. **A.** Plântulas submetidas ao tratamento com líquen+H₂O_d, **B.** Plântulas tratadas com líquen+ureia 0,1 mg.mL⁻¹, **C.** Controle, **D.** Plântulas tratadas com líquen+ureia 0,1 mg.mL⁻¹, **E-F.** Plântulas tratadas com líquen+ureia 1,0 mg.mL⁻¹, **G.** Plântulas tratadas com ureia 0,1 mg.mL⁻¹ sem a presença do líquen. (Barra: A-G = 2cm).

O peso seco das plântulas foi inibido pelo talo liquênico+ureia 1,0 g.dm⁻³ em 80,23% e sem a presença do talo as plântulas morreram (Fig. 5). Os líquens sintetizam urease, que é uma hidrolase que catalisa a transformação da ureia em carbonato de

amônia, e um subsequente desdobramento deste sal (NO) em amônia e CO₂ (Tauber, 1955), como uma resposta à adição de ureia exógena (Legaz e Brown, 1983) sendo sintetizada por ambos os biontes. Vicente *et al.* (1984) observaram que o líquen *Cladonia sandstedei*, quando recebe suprimento exógeno de ureia, ativa sua urease, promovendo um excelente *turn over* ureia/urease, incrementando, dessa forma, a síntese de seus fenóis. O micobionte de *Cladonia verticillaris* retém aproximadamente em 25% da atividade de urease total do talo e, segundo Legaz *et al.* (2006), o FUM inibe essa enzima. Os resultados deste estudo demonstram que *C. verticillaris* possui efeito alelopático interferindo na assimilação de nutrientes.

Observou-se que a ureia sem talos liquênicos também interfere no desenvolvimento de plântulas, sendo benéfico até a concentração 0,1 g.dm⁻³ produzindo plântulas normais com pequenos defeitos (Tab. 1); acima dessa concentração as plântulas não se desenvolvem dentro dos padrões de normalidade. O tratamento com líquen+ureia 0,1 g.dm⁻³ induziu a formação de plântulas anormais (Tab.1), com raízes grossas, com poucas raízes laterais, sem desenvolvimento de eófilos e formação de necroses nos ápices radiculares (Fig. 4B e 4D). Segundo Maraschin-Silva e Aquila (2006) o escurecimento e a fragilidade das raízes são danos que apontam a ação de substâncias tóxicas. Cruz-Ortega *et al.* (1998) relatam que o endurecimento e escurecimento dos ápices radiculares são evidências de alterações morfológicas e ultraestruturais causadas por fitotoxinas.

Na Figura 1 observou-se um efeito alelopático mais pronunciado no bioensaio pós-emergente que no pré-emergente. Segundo Aquila (2000) este resultado do pré-emergente pode estar relacionado com a utilização das reservas da própria semente, que poderia fazer com que a germinação fosse menos suscetível a fatores exógenos.

Algumas substâncias liquênicas são lixiviadas ao solo inibindo o crescimento de plantas superiores e inferiores (Marante *et al.*, 2003; Romagni *et al.*, 2004), podem influenciar na fertilidade do solo e na ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (Silva, 2007). Cowles (1982) estabeleceu que exsudatos de *Cladina stellaris* inibiam completamente o crescimento de *Spruce Black* (conífera), e Balke (1985) relatou que os compostos liquênicos também podem diminuir a captação de nutrientes de plantas vasculares. Como Asahina e Shibata (1954), Vicente (1975) e Hale (1983) declaram que os compostos liquênicos são em sua maioria insolúveis em água, é possível que esses

efeitos observados sejam devido à ativação da ureia endógena quando submetidos água (Pereira *et al.*, 1986). Por meio dessas substâncias, os líquens travam batalhas químicas em suas fronteiras, defendendo ativamente suas áreas de ocupação.

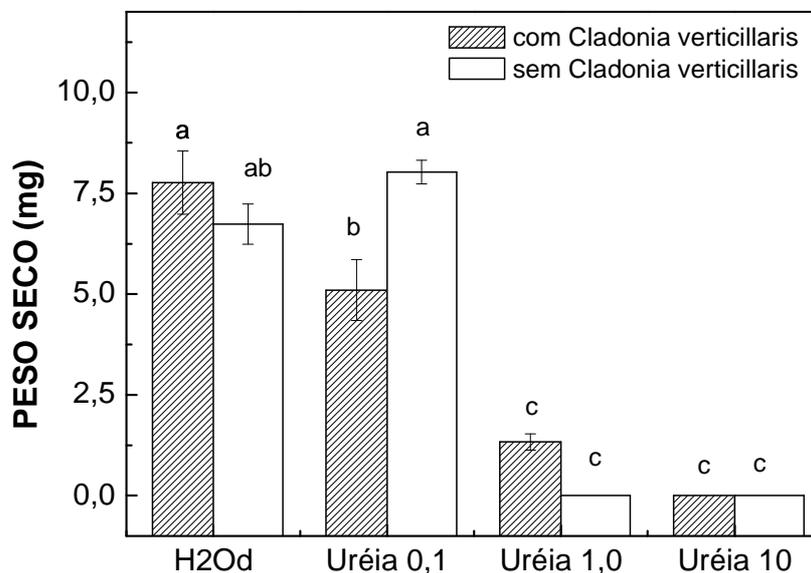


Figura 5. Valores médios da massa seca de plântulas de *Lactuca sativa* germinadas previamente em água destilada e depois transferidas para os bioensaios com *Cladonia verticillaris* e suprimento exógeno de ureia nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 g.dm⁻³, utilizando água destilada como controle e ureia nas mesmas concentrações sem a presença de *C. verticillaris*; avaliadas 10 dias após a germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), médias \pm SE, $n = 3$.

3.3 Análise Química

Observou-se na tabela 4 que a associação de ureia a *C. verticillaris* altera os valores de pH do meio. A morte das plântulas, quando submetidas ao líquen associado com ureia a 10 g.dm⁻³, pode ter sido causada pelo pH do meio, que encontrava-se fora da faixa tolerante por *L. sativa*. Baskin & Baskin (1998) relatam que *L. sativa* apresenta uma ampla faixa de pH para germinação, com valores entre 3,0 e 7,0. Esses exsudatos podem também ter sido responsáveis pela oxidação do líquen devido à alteração no metabolismo de *C. verticillaris*. Segundo Tauber (1955) a atividade ótima da urease se processa em pH 7,0. Gardner e Muller (1981) observaram que o pH do FUM

influenciava na germinação dos esporos de *Funaria hygrometrica*. Relataram que 97% germinavam quando submetidos aos valores de pH 6, 7 e 8 e, 41% em pH 5. Abeliovich e Azov (1976) constataram que a amônia, em concentrações superiores a 2,0 mM e a valores de pH acima de 8,0 inibe a fotossíntese e crescimento de *Scenedesmus obliquus*, uma espécie dominante na maior taxa de lagoas de oxidação de águas residuais. Portanto, os pHs observados estão dentro dos parâmetros esperados para atividade do FUM, que pode ser o responsável pelos resultados de estímulo e inibição observados nos bioensaios na figura 2.

Tabela 4. Valores de pH da ureia e da água destilada antes da instalação dos bioensaios e dos exsudatos após 10 dias de experimento.

Tratamentos (mg/mL)	pH da Ureia	pH dos Exsudatos
Água destilada	5,0	5,0
Ureia 0,1	7,0	5,0
Ureia 1,0	7,0	7,0
Ureia 10,0	6,5	8,5

A tabela 5 mostra os rendimentos dos extratos obtidos dos talos e lixiviados durante o bioensaio pré-emergente. Verificou-se que havia um aumento proporcional da concentração em relação as doses de ureia e, que essa concentração foi diminuída no decorrer dos experimentos.

Analisando a concentração de ureia no lixiviado (Fig. 6A) e no talo (Fig. 6B) observou-se que essas variáveis não apresentaram diferenças significativas em função do tempo. Contudo notou-se que a ureia a 0,1 g.dm⁻³ induziu a um aumento na produção de ureia a partir do sexto dia do experimento, sendo este aumento mais acentuado no lixiviado que no talo. No bioensaio com ureia 10,0 g.dm⁻³, houve um aumento dessa produção no sexto dia e posteriormente um decréscimo até o seu desaparecimento no meio no nono dia (Fig. 6). Esses resultados evidenciam que *C. verticillaris* pode ter capturado a ureia para ser hidrolisada pelo talo, uma vez que a quantidade de ureia recuperada pelo talo não aumenta na mesma proporção do seu desaparecimento do lixiviado. Vicente e Xavier Filho (1979) relataram que essa espécie líquênica é capaz de

sintetizar urease por indução nutricional. Vasconcelos (2013) descreveu que a ureia produz uma maior atividade urease no talo que no meio.

Tabela 5. Rendimentos dos extratos do talo e do lixiviado de *Cladonia verticillaris* submetida a ureia exógena (0; 0,1; 1,0 e 10,0 g.dm⁻³) no terceiro, sexto e nono dia do experimento.

TRATAMENTOS	RENDIMENTOS (mg)					
	LIXIVIADO			TALO		
	3ª dia	6ª dia	9ª dia	3ª dia	6ª dia	9ª dia
AGUA	9,0	2,0	0,003	8,0	1,0	0,001
UREIA 0,1 g.dm⁻³	9,5	1,0	0,001	7,0	0,0	0,003
UREIA 1,0 g.dm⁻³	11,5	3,0	0,004	39,0	1,0	0,001
UREIA 10,0 g.dm⁻³	27,5	13,0	0,008	34,0	4,0	0,003

As tabelas 2 e 3 sumarizam os dados quantitativos dos cromatogramas dos lixiviados e dos extratos do talo submetidos à ureia analisados no terceiro, sexto e nono dia. Observou-se que a concentração de compostos fenólicos é maior no talo que no lixiviado, porém a concentração de substâncias encontradas no lixiviado é bem significativa, podendo em condições naturais alcançarem espécies-alvo e causarem efeitos de estímulo ou inibição interferindo no desenvolvimento das plântulas ao seu redor. Esses resultados também demonstram a hidrossolubilidade desses compostos e que a ureia é um bom extrator de FUM e PRO. Constatou-se também que as concentrações dos aleloquímicos decrescem em relação ao tempo, e que a relação de FUM/ATR e PRO/ATR aumenta, o que pode estar relacionado a situação de estresse para o líquen ou a formação de produtos de degradação. Além disso, apesar do FUM e PRO serem substâncias majoritárias em *C. verticillaris* (Ahti *et al.*, 1993; Pereira, 1998), é provável que elas não sejam as responsáveis pelos severos efeitos (clorose, oxidação radicular, elevadas inibições do crescimento) observados pelos extratos no crescimento das plântulas. Assim, é possível, ainda, que elas atuem em sinergismo com outras substâncias não identificadas, ou ainda que esses efeitos sejam atribuídos a essas substâncias, visto a sua baixa relação com FUM/PRO, FUM/ATR e PRO/ATR. Segundo Geyer e Feige (1987), substâncias em baixas concentrações são metabólitos biogeneticamente relacionados.

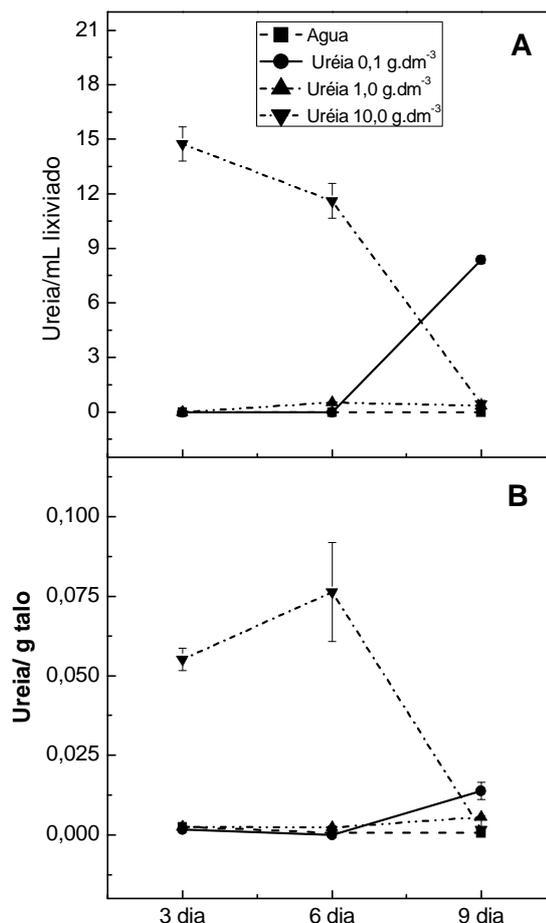


Figura 6. Concentração de ureia no talo e no lixiviado de *Cladonia verticillaris* submetida a suprimento exógeno de ureia na concentração 0,1; 1,0 e 10,0 g.dm⁻³, utilizando água destilada como controle, no terceiro, sexto e nono dia do bioensaio de germinação. Médias \pm SE, n = 3.

Através dos *spots* detectados através da UV/VIS e valores de Rf na CCD foi possível visualizar que *C. verticillaris* não incubada nos bioensaios produziu apenas o FUM e a ATR (Fig. 7B). Contudo observou-se que o lixiviado produzido durante os dez dias do bioensaio por líquen+água deionizada e líquen+ureia a 0,1 g.dm⁻³ induziu além da formação de FUM e ATR, a produção de substâncias intermediárias da biossíntese do FUM e quando analisado líquen+uréia 1,0 g.dm⁻³ verificou-se que não havia a presença de ATR, mas a o aparecimento de PRO e as mesmas substâncias intermediárias presentes nos demais tratamentos (Fig. 7B), porém a presença de PRO no lixiviado não foi detectada por CLAE nesse tratamento no nono dia de experimento. Notou-se também que quando *C. verticillaris* foi submetida a ureia 10,0 g.dm⁻³ esta não

induzia a liberação de FUM e PRO para o meio (Fig. 7B e Tab. 3). A detecção de uma maior concentração de PRO e ATR nos primeiros dias do bioensaio pode estar relacionada com ativação da urease para formação de FUM, visto que PRO e ATR são substâncias acessórias na síntese de FUM (Pereira *et al.*, 1999).

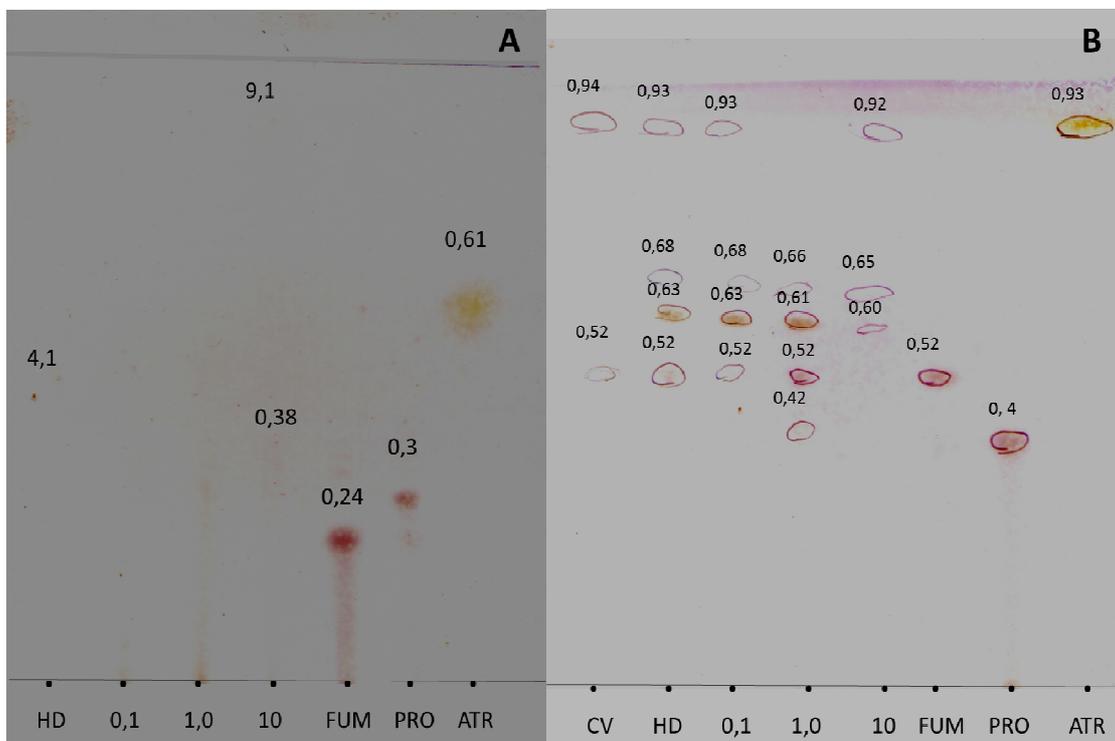


Figura 7. Cromatografia de camada delgada dos extratos dos talos de *Cladonia verticillaris* após dez dias da instalação dos bioensaios (A) e da fração fenólica dos exsudatos (B). HD: Água deionizada; 0,1-10: Concentrações de ureia; PRO: ácido protocetrário; FUM: Ácido fumarprotocetrário; ATR: Atranorina; CV: Extrato do talo natural de *Cladonia verticillaris*.

Esses resultados revelam que a presença e concentração destas substâncias líquênicas no meio são influenciados por fatores exógenos como ureia, utilizada em fertilizantes, pela dose e pelo tempo de permanência a que o líquen é exposto a esse composto nitrogenado. Observou-se ainda na tabela 3 que a água induz a uma maior liberação dos metabólitos líquênicos ao meio, que em condições de campo podem ser liberados pela água da chuva, tornando os organismos adjacentes ao líquen mais susceptíveis a ação desses aleloquímicos, o que corrobora com os dados obtidos na

figura 2. Legaz *et al.* (2006) constataram que quando o talo líquenicos são lavados pela água da chuva os fenóis acumulados na superfície cortical são lixiviados para o substrato, podendo percorrer o perfil do solo e interagir com íons minerais. Pereira *et al.* (1999) relataram que o metabolismo do FUM requer uma molécula de água adicionada à cadeia lateral do PRO. Portanto, quando disponível em um solo com muita água, o FUM sofre hidrólise espontânea da ligação éster, liberando a molécula de água e, disponibilizando mais PRO ao ambiente em detrimento do FUM. Vasconcelos (2013) observou que em solo hidratado essa hidrólise é intensificada, aumentando em 73% a transformação de FUM em PRO e apenas 10,7% em solo seco.

No talo de *C. verticillaris* utilizada durante o bioensaio não foi detectada nenhuma substância nos tratamentos com ureia a 0,1 e 1,0 g.dm⁻³. Em todas as amostras não registrou-se a presença de FUM, PRO ou ATR por CCD (Fig. 7A), mas foram detectadas por CLAE (Tab. 3). Comparando o tempo zero, extração antes da instalação do bioensaio, com os tratamentos com e sem ureia durante nove dias do experimento, notou-se um significativo aumento da concentração dos compostos fenólicos no terceiro dia, e decréscimo no decorrer do tempo (Tab. 4), com exceção do tratamento com ureia 1,0 g.dm⁻³ que apresentou um significativo aumento de PRO no nono dia do bioensaio. Esses aumentos podem estar relacionados às condições de estresse que esse líquen foi submetido como o tempo de incubação, quantidade de água e concentração de ureia, fazendo com que haja uma hiperprodução dos seus aleloquímicos como mecanismo de defesa. Resultados análogos foram obtidos por Mota Filho *et al.* (2007) que relataram que *C. verticillaris* submetida à poluição ambiental foi capaz de produzir e acumular altos teores do PRO, como resposta aos poluentes atmosféricos, que também impediram a síntese completa do FUM. Em outros estudos observou-se um aumento da concentração desses compostos ao nível cortical quando esta espécie foi submetida a um ambiente industrial petroquímico, ou a produtos manufaturados dessa indústria (Villarouco, 2007).

Diante desses resultados pode-se concluir que a água e a ureia exógena ativa a urease de *C. verticillaris* levando ao aumento do potencial alelopático dessa espécie e que concentrações elevadas de ureia como 10,0 g.dm⁻³ induz a danos irreversíveis ao líquen. Portanto, o uso indiscriminado de ureia como fertilizante torna-se um fator preocupante, pois pode causar sérios problemas aos ecossistemas.

AGRADECIMENTOS

R. C. Tigre e E. C. Pereira são gratos a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES, Brasil), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelos apoios e as bolsas de estudo e concedidos. Este trabalho foi financiado por uma doação do Ministério da Ciência e Inovação (Espanha), BFU2009-11983 para Professores C. Vincente M. e E. Legaz.

REFERÊNCIAS

Abeliovich, A.; Azov, Y. 1976. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. **Applied and Environmental Microbiology** **31**: 801-806.

Ahti, T. 1993. Cladoniaceae. *In*: W. Greuter [ed.], Names in current use in the families Trichocomaceae, Cladoniaceae, Pinaceae, and Lemnaceae. **Regnum Vegetabile** **128**: 58–106.

Aloni, R.; Aloni E.; Langhans, M.; Ullrich, C.I. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. **Annals of Botany** **97**: 883-893.

Aqüila, M.E.A. 2000. Efeito alelopático de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. **Iheringia Série Botânica** **53**: 51-66.

Asahina, Y.; Shibata, S. 1954. **Chemistry of Lichen Substances**. Tokyo. Japanese Society Promotion of Science.

Balke, N.E. 1985. Effects of allelochemicals on mineral uptake and associated physiological processes. **ACS Symposium Series** **268**: 161-178.

Baskin, C.C.; Baskin, J.M. 1998. **Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination**. New York: Academic Press, 666 p.

Benicasa, M.M.P. 1988. **Análise de crescimento da plantas**. FUNEP, Jaboticabal.

Bewley, J.D.; Black, M. 1978. **Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination**. Springer-Verlag, New York.

Blanco, M.J; Suarz, C.; Vicente, C. 1984. Use of urea by *Evernia prunastri* thall. **Planta 162**: 305-310.

Bobbink, R.; Hicks, K.; Galloway, J.; Spranger, T.; Alkemade, R.; Ashmore, M.; Bustamante, M.; Cinderby, S.; Davidson, E.; Dentener, F.; Emmett, B.; Erisman, J.W.; Fenn, M.; Gilliam, F.; Nordin, A.; Pardo, L.; De Vries, W. 2010. Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. **Ecological Applications 20**: 30-59.

Bradow, J.M. 1991. Relationships between chemical structure and inhibitory activity of C6 through C9 volatiles emitted by plant residues. **Journal Chemical Ecology 17**: 2193 – 2212.

Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília. 399p.

Brown, R.; Mikola, P. 1974. The influence of fruticose soil lichens upon the mycorrhizae and seedling growth of forest trees. **Acta Forestalia Fennica 141**: 5-23.

Cowles, S. 1982. Preliminary results investigating the effect of lichen ground cover on the growth of black spruce. **Naturaliste Canadien 109**: 573-581.

Cruz-Ortega, R.; Ayala-Cordero, G.; Anaya, AL. 2002. Allelochemical stress produced by the aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: effects on roots of bean, maize, and tomato. **Physiologia Plantarum 116**: 20-27.

Culberson, C. F. 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin layer-chromatography method. **Journal of Chromatography 72**: 113-125.

Einhellig, F.A.; Rasmussen, J.A. 1979. Effects of tree phenolics acids on chlorophyll content and growth of soybean and grain sorghum. **Journal of Chemical Ecology** **5**: 815-24.

Ferreira, A.G.; Aquila, M.E.A. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** **12**: 175-204.

Galloway, J.N.; Dentener, F.J.; Capone, D.G.; Boyer, E.W.; Howarth, R. W.; Seitzinger, S.P.; Asner, G.P.; Cleveland, C.; Green, P.; Holland, E.; Karl, D.M.; Michaels, A.F.; Porter, J.H.; Townsend, A.R.; Vörösmarty, C. 2004. Nitrogen cycles: past, present, and future. **Biogeochemistry** **70**: 153–226.

Galloway, J.N.; Townsend, A.R.; Erisman, J.W.; Bekunda, M.; Cai, Z.; Freney, J.R.; Martinelli, L.A.; Seitzinger, S.P.; Sutton, M.A. 2008. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. **Science** **320**: 889-892.

Gao, X.; Chen, S.; Xie, X.; Long, A.; Ma, F. 2007. Non aromatic hydrocarbons in surface sediments near the Pearl River estuary in the South China Sea. **Environmental Pollution** **148**: 40-47.

Gardner, C.R.; Mueller, D.M.J. 1981. Factors affecting the toxicity of several lichen acids: effect of pH and lichen acid concentration. **American Journal of Botany** **68** (1): 87-95.

Geyer, M.; Feige, G.B. 1987. Analysis of depsides, depsidonas, and other lichen specific aromatics by high performance liquid chromatography. **Bibliotheca Lichenologica** **25**: 467-468.

Guzman, G.; Xavier-Filho, L.; Pereira, E.CG. 1984. Flujo de nutrientes em comunidades de tundra Antartica. **Boletim Antartico Chileno** **4**:82-84.

Hale-Jr., M. E. 1983. **The Biology of Lichens**. 3ed. London. Edward Arnold Pub., 90p.

Howarth, R.; Swaney, D.; Billen, G.; Garnier, J.; Hong, B.; Humborg, C.; Johnes, P.; Marth, C.M.; Marino, R. 2011. Nitrogen fluxes from the landscape are

controlled by net anthropogenic nitrogen inputs and by climate. **Frontiers in Ecology and the Environment** 10 (1):37–43.

Hugron, S.; Poulin, M.; Rochefort, L. 2013. Organic matter amendment enhances establishment of reintroduced bryophytes and lichens in borrow pits located in boreal forest highlands. **Boreal Environment Research** 18: 317-328.

Iskandar, IR.; Syers, J.I. 1971. Solubility of lichen compounds in water: pedogenetic implications. **The Lichenologist** 5: 45-50.

Iskandar, I.K.; Syers, J.K.; 1973. Pedogenetic significance of lichens. Pp. 225-248. In: Ly, V.; Ahmadjian; Hale. Jr., M.E. **The Lichens**. Academic Press. New York, W.

Jerônimo, 2006. **Efeitos do extrato aquoso de folhas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. No desenvolvimento inicial e na síntese protéica de plântulas de *Sesamum indicum* L.** Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília.

Labouriau, L.G. 1983. **A germinação de sementes**. OEA, Washington, DC.

Legaz, M. E.; Brown, H. 1983. Factors affecting urease activity in the lichen *Evernia prunastri*. **Annals of Botany** 52: 261–264.

Legaz, M.E.; Millanes, A.M.; Vicente, C. Fisiologia dos Líquens. Pp. 145-252. In: Xavier-Filho, L.; Legaz, M.E.; Vicente, C.; Pereira, E.C.G. 2006. **Biologia de Líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural.

Lima, R.M.C.; Nascimento, S.C.; Pereira, E.C.P.; Campos-Taki, G.M. 1990. Atividade citotóxica e antitumoral de extratos liquênicos. **Boletim da Sociedade Broteriana** 63 (24): 339-348.

Marante, F.J.T.; Castellano, A.G.; Rosas, F.E.; Aguiar, J;Q.; Barreira, J.B. 2003. Identification and quantification of allelochemica from the lichen *Lethariella canariensis*: Phytotoxicity and antioxidative activity. **Journal Chemical Ecology** 29: 2049-2071.

Investigação dos mecanismos de ação dos aleloquímicos de *Cladonia verticillaris*

Marchesani, E.; Grohsi, M. Santos, D.S.; Formentinii, T.C.; Silva, L.S.; Sartori, G.M.S.; Fontes, R.B.F. 2011. Alternativas à ureia no fornecimento de nitrogênio para o arroz irrigado. **Ciência Rural** **41** (12): 2053-2059.

Maraschin-Silva, F.; Aquila, M.E.A. 2006. Potencial Alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica** **20** (1): 61-69.

Matson, P.; Lohse, K.; Hall, S. 2002. The globalization of nitrogen: consequences for terrestrial ecosystems. **Ambio** **31**: 113–119.

Moissejeva, E. N. 1961. **Biochemical propiets of lichens and tehir practical importance**. Izdatel'stwo Akademila Nank. Moscel.

Mota-Filho, F.O.; Pereira, E.C.G.; Lima, E.S.; H., Silva. N.; Figueiredo, R.C.B.; Pereira, E.C. 2007. Influência de poluentes atmosféricos em Belo Jardim (PE) utilizando *Cladonia verticillaris* (líquen) como biomonitor. **Química Nova** **30** (5): 1072-1076.

Nash III, T.H. 2008. Nutrients, elemental accumulation and mineral cycling. – Pp. 234-251. In: Nash III, T. H. (Ed.), **Lichen biology**. Cambridge Univ. Press.

Oliveira, A.F.M. 1991. **Ação alelopática de *Cladina dendroides* Abb. (Líquén) e influência da associação da uréia na germinação de sementes de *Lactuca sativa* (alface)**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco.

Oliveira, S.C.C.; Ferreira, A.G. and Borghetti, F. 2004. Effect of *Solanun lycocarpum* fruit on sesame seed germination an seedling growth. **Allelopathy Journal** **13** (2):201-210.

Pereira, E.C.G.; Paulo, M. Q.; Xavier-Filho. 1986. Screening of urease activity in five Antarctic lichens. **Plant Physiology and Biochemistry** **1**: 85-90.

Pereira, E.C.; Molina, M. C.; Pedrosa, M. M.; Solas, M. T.; Vicente, C. & Legaz, M.E. 1995. Production of ribitol by alginate-immobilized cells of the lichen *Cladonia verticillaris*. **Anales de Química** **91** (3-4): 253-259.

Pereira, E. C. 1998. **Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae a partir de imobilização celular**. Recife, 240p. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade Federal de Pernambuco.

Pereira, E.C.; Silva, N.H.; Andrade, L.C.; Vicente, C.; Legaz, M.E. 1999. Production of lichen metabolites by immobilized cells of *Cladonia clathrata* Ahti et al. e Xavier Filho. **Phyton 39**: 79-89.

Pina, G. O. 2008. **Efeitos Alelopáticos de Eugenia dysenterica Dc (Myrtaceae) sobre a germinação, crescimento e morfoanatomia de Sesamum indicum L. (Pedaliaceae -gergelim), e Raphanus sativus (Brassicaceae - rabanete)**. Dissertação, Mestrado em Botânica, Universidade de Brasília, Brasília.

Rahmatullah, M., Boyde, T.R.C. 1980. Improvements in the determination of urea using diacetylmonoxime: methods with and without deproteinisation. **Clinica Chimica Acta 107**: 3-9.

Rizvi, S.J.H.; Rizvi, V. Pp. 443-472. Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. 1992. In: Rizvi, S.J.H. & Rizvi, H. (Eds.). **Allelopathy: Basic and applied aspects**. London, Chapman & Hall.

Romagni, J.G.; Rosell, R.C.; Nanayakkara, N.P.D.; Dayan, F.E. 2004. Allelopathy, chemistry and mode of action of allelochemicals. Pp 13-33. **Ecophysiology and potential modes of action for selected lichen secondary metabolites**. Boca Raton, FL: CRC Press.

Santiago, R.; de Armas, R.; Legaz, M.E.; Vicente, C. 2008. Separation from *Ustilago scitaminea* of different elicitors which modify the pattern of phenolic accumulation in sugarcane leaves. **Journal of Plant Pathology 90** (1): 87-96.

Silva, F. P. 2007. **Influência de Cladonia salzmannii na ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em rizosfera e desenvolvimento de plântulas**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco.

Syrett, P. J. 1962. En R. A. Levin. **Physiology and Biochemistry of Algae**. Academic Press. New York. p. 171.

Tauber, H. 1955. **The chemistry and technology of enzymes**. London, John, Wiley, 755p.

Tigre, R.C.; Silva, N.H.; Santos, M.G.; Honda, N.K.; Falcão, E.P.S; Pereira, E.C. 2012. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Latuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** **84**: 125–132.

Trivelin, P.C.O.; Oliveira, M. W.; Vitti, A. C.; Gava, G.J.C.; Bendassolli, J.A. 2002. Perdas do nitrogênio da ureia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **37** (2): 193-201.

Vasconcelos, T. L. 2007. **Efeito do suprimento exógeno de uréia na produção de substâncias degradadoras do migmatito pelo líquen *Cladonia verticillaris***. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Geografia, Universidade Federal de Pernambuco.

Vasconcelos, T.L. 2013. **Efeitos da expansão agrícola sobre ecossistemas: ação de fertilizantes nitrogenados no comportamento de líquens da Mata Atlântica**. Tese de doutorado. Departamento de Geografia. Universidade Federal de Pernambuco.

Vicente, C.; Xavier-Filho, L. 1979. Urease regulation in *Cladonia verticillaris*. **Phyton** **37**: 137-144.

Vicente, C.; Legaz, M. E.; Arruda, E. & Fscnilho, L. X. 1984. The utilization of urea by the lichen *Cladonia sandstedei*. **Journal of Plant Physiology** **115**: 397–404.

Vicente, C. 1975. **Fisiologia de las substancias liquênicos**. 1. Ed. Madrid. Alhandra S.A., 162p.

Villarouco, F.M.O; Freire, E.V.F; Pereira, E.C.; Perez, R.E.U. 2007. Análise do líquen *Cladonia verticillaris* (RADDI) Fr., em condições de laboratório sob efeito do estireno e cliclohexano. **Interciência** **32** (4): 242-246.

Yano, A. M. 1994. **Atividade biológica de *Cladonia verticillaris* e *Cladonia substellata* sobre a germinação e desenvolvimento da plântula *Allium cepa***. 126f.

Investigação dos mecanismos de ação dos aleloquímicos de *Cladonia verticillaris*

Dissertação. Curso de Mestrado em Criptógamos). Departamento de Micologia,
Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco.

Xavier-Filho, L.; Paulo, M.Q.; Vicente, C.; Legaz, M.E. 1985. Phenols from
Cladonia sandstedei analyzed by HPLC. **Cryptogamie. Bryologie, lichenologie** 6
(2):143-150.



Conclusões

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho foram satisfatórios e responderam aos objetivos de forma esclarecedora, na medida em que tiveram uma relação direta com as hipóteses levantadas inicialmente. Foram desvendados novos sítio-alvo de ação dos compostos alelopáticos de *C. verticillaris* ao nível estrutural, fisiológico e bioquímico, e como os fatores abióticos como radiação gama e ação antrópica através do suprimento exógeno de ureia podem alterar o metabolismo liquênico.

Os resultados apresentados, em suma, levaram a perda e ao ganho progressivo de pigmentos fotossintéticos, a perda da capacidade fotoquímica medida pela reação de Hill, a qual situa a ação dos compostos fenólicos liquênicos no domínio água-PSII-plastoquinonas. Essa observação foi adicionada às respostas obtidas pelas células de *L. sativa* que demonstraram bastante sensibilidade aos aleloquímicos, tendo seus cloroplastos degradados, membranas destruídas e dissolvidos os tilacóides. Estas disfunções celulares induziram alterações visíveis no crescimento das plântulas como necroses e consequente morte celular. As alterações das membranas das organelas sem dúvida estão relacionadas à acumulação de EROs e às atividades relacionadas ao estresse oxidativo, como visto através das mudanças das atividades das enzimas antioxidantes. *S. lycopersicum* assim como o HC apresentam menor sensibilidade a ação dos aleloquímicos.

A radiação gama e a adição de ureia exógena aceleram uma resposta fisiológica em *C. verticillaris* como uma forma de defesa, induzindo alterações na produção de compostos alelopáticos, sendo os efeitos observados de estímulo e inibição do crescimento das plântulas-teste. Essas ações são dependentes dos aleloquímicos presentes nos extratos e muitas delas são oriundas de uma ação sinérgica ou antagônica.



Anexos





Potential phenolic bioherbicides from *Cladonia verticillaris* produce ultrastructural changes in *Lactuca sativa* seedlings



R.C. Tigre^a, E.C. Pereira^a, N.H. da Silva^b, C. Vicente^{c,*}, M.E. Legaz^a

^a Department of Geographical Sciences, Federal University of Pernambuco, Prof. Moraes Rego Av., CEP 50.740-901, Recife, PE, Brazil

^b Department of Biochemistry, Laboratory of Natural Products, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^c Team of Intercellular Communication in Plant Symbiosis, Faculty of Biology, Complutense University, 12, José Antonio Novais Av., 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 November 2014

Received in revised form 26 January 2015

Accepted 1 February 2015

Available online xxx

Edited by L. Sebastiani

Keywords:

Cladonia verticillaris

Lactuca sativa

Depsidones

Leaf

Root

Ultrastructure

ABSTRACT

The possibilities for using phenolics, extracted from the lichen *Cladonia verticillaris* with different organic solvents, as bioherbicides have herein been studied through observation of the ultrastructural changes produced in *Lactuca sativa* seedlings. The different extracts mainly contain protocetraric and fumarprotocetraric acids and very small amounts of atranorin. It has been observed that the roots of lettuce seedlings grow more rapidly in the presence of the phenols than in their absence. This fact is supported by a minor number of lobes and less indentation of the parenchymatous cells as well as a major appearance of active dictyosomes in their cytoplasm. Nevertheless, seedling leaves developed in the presence of these extracts show drastic degenerative changes. Intergranal lamellae of chloroplasts disappear whereas thylakoids are melted in amorphous masses. In some cases, the number of dictyosomes increases in parenchymatous cells and mitochondria disorganize their internal membranes, though in a minor degree of that observed for chloroplasts.

© 2015 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The use of traditional herbicides, which diminishes the costs of agricultural production, many times results in a negative environmental impact. Probably, this is the main reason why no new herbicides with a new target site have been commercialized in nearly 20 years (Dayan et al., 2012). Thus, the study of plant allelochemicals is currently developed in the search of new natural herbicides in order to avoid the ecological impact that the chemically-synthesized compounds produce (Duke et al., 2002). For example, secondary metabolite extracts from the leaves of *Ailanthus altissima* are powerful herbicidal and insecticidal substances. They produce a strong inhibitory effect on seed germination and plant growth of *Medicago sativa* (Tsao et al., 2002). A phytotoxin, xanthinosin, has been isolated from *Xanthium italicum*. This sesquiterpene lactone significantly affects the growth of both *Lactuca sativa* and *Amaranthus mangistanum* as well as impedes seed germination (Shao et al., 2012). The phenolic compound 3,4-dihydroxy-acetophenone, isolated from leachates of *Picea schenkiana* needles also inhibits germination and plant growth of lettuce, *Cucumis sativus* and *Phaseolus radiatus* (Ruan et al., 2011).

Under this point of view, lichens produce allelopathic phenolics that could be used as natural herbicides. This idea is sustained on three

experimentally verified facts: 1. their allelopathic action against higher plants; 2. their solubility in water, which facilitates their use as phytosanitary compounds and 3. their biodegradability by soil microorganisms, that impedes their accumulation in cultured soils.

Concerning the first point, Nieves et al. (2011) found that methanolic extracts of *Everniastrum sorocheilum* (Parmeliaceae), *Usnea roccellina* (Parmeliaceae) and *Cladonia confusa* (Cladoniaceae) inhibit germination and root growth of *Trifolium pratense*. Lecanoric, barbatic and gyrophoric acids behave as uncouplers of the photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts of tobacco and spinach (Endo et al., 1998; Takahagi et al., 2006). (–)-Usnic acid inhibits the biosynthesis of both chlorophylls and carotenoids by acting on the enzyme 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase, inducing death of *L. sativa* seedlings (Romagni et al., 2000) and raises the susceptibility of chlorophylls to photodegradation (Latkowska et al., 2006). The same compound as well as its (+) enantiomer inhibit transpiration and water photolysis of corn and sunflower seedlings (Lascève and Gaugain, 1990; Vavasseur et al., 1991; Legaz et al., 2004; Latkowska et al., 2006; Lechowski et al., 2006).

Responses to germination and initial growth of *L. sativa* (lettuce) subjected to organic extracts and purified compounds of *C. verticillaris* were analyzed by Tigre et al. (2012). *C. verticillaris* extracts induce modifications of the size of leaf area and the length of seedling hypocotyl of lettuce seedlings whereas root development occurred. During growth experiments, seedlings exposed to ether or acetone extracts showed

* Corresponding author. Fax: +34 1 3945034.

E-mail address: cvicente@bio.ucm.es (C. Vicente).

diminished hypocotyl and stimulated root growth, compared to the controls. Increases of extract concentrations led to the formation of abnormal seedlings. The main components of these extracts, fumarprotocetraric and protocetraric acids (Fig. 1), induced at all the assayed concentrations an increase of leaf area of lettuce seedlings, indicating a possible bioherbicide potential of these acids. In contrast, hypocotyl and root hyper-elongation was observed only in the presence of protocetraric acid.

Toledo et al. (2003) reported that the substances composing the phenolic fraction of *Lethariella canariensis*, which were lixiviated by rainwater and deposited in the soil, disable the germination of cabbage, lettuce, pepper and tomato seeds. On the other hand, it has been described that lichen phenols retained by the soil can be used as a substrate for growth of soil microorganisms, which use them as a carbon source, such as usnic and perlatolic acids from *Cladonia stellaris* (Stark and Hyvärinen, 2003). This biodegradability is an additional inducement to advance and to insist on the study of the use of allelochemicals as bioherbicides, since they would not accumulate irreversibly in the soils.

Concerning the second point (water solubility), Zagoskina et al. (2013) found that water-soluble phenolics in the lichens *Peltigera*

aphthosa, *Solorina crocea*, *Cetraria islandica*, *Flavocetraria nivalis*, *Cladonia uncialis*, and *Cladonia arbuscula* were represented by 7–12 phenolic compounds with similar qualitative composition in the species of the same order. In addition, water solubility of lichen phenolics can be enhanced after conjugation to sugars and amino acids (Nikolaev et al., 2014), and polyamines (Fontaniella et al., 2001).

On the other hand, small organic molecules originating from above-ground vegetation generally constitute an important C source for the soil microbial community. Results obtained by Stark and Hyvärinen (2003) for soil microorganisms living under *C. stellaris* mats suggest that the usnic and perlatolic acids that leach from the lichens form a source for energy for the microbial community in the soil under the lichen carpet. Both *Mortierella isabellina* (Kutney et al., 1978) and *Mucor globosus* (Kutney et al., 1984) fungi isolated from soils produce, respectively, hydrolysis or deacylation of usnic acid.

Since many of these lichen compounds inhibit growth, respiration and photosynthesis of sensitive plants, these changes must be accompanied by changes in the cellular ultrastructure that supports the above mentioned physiological functions, which constitutes the aim of this research.

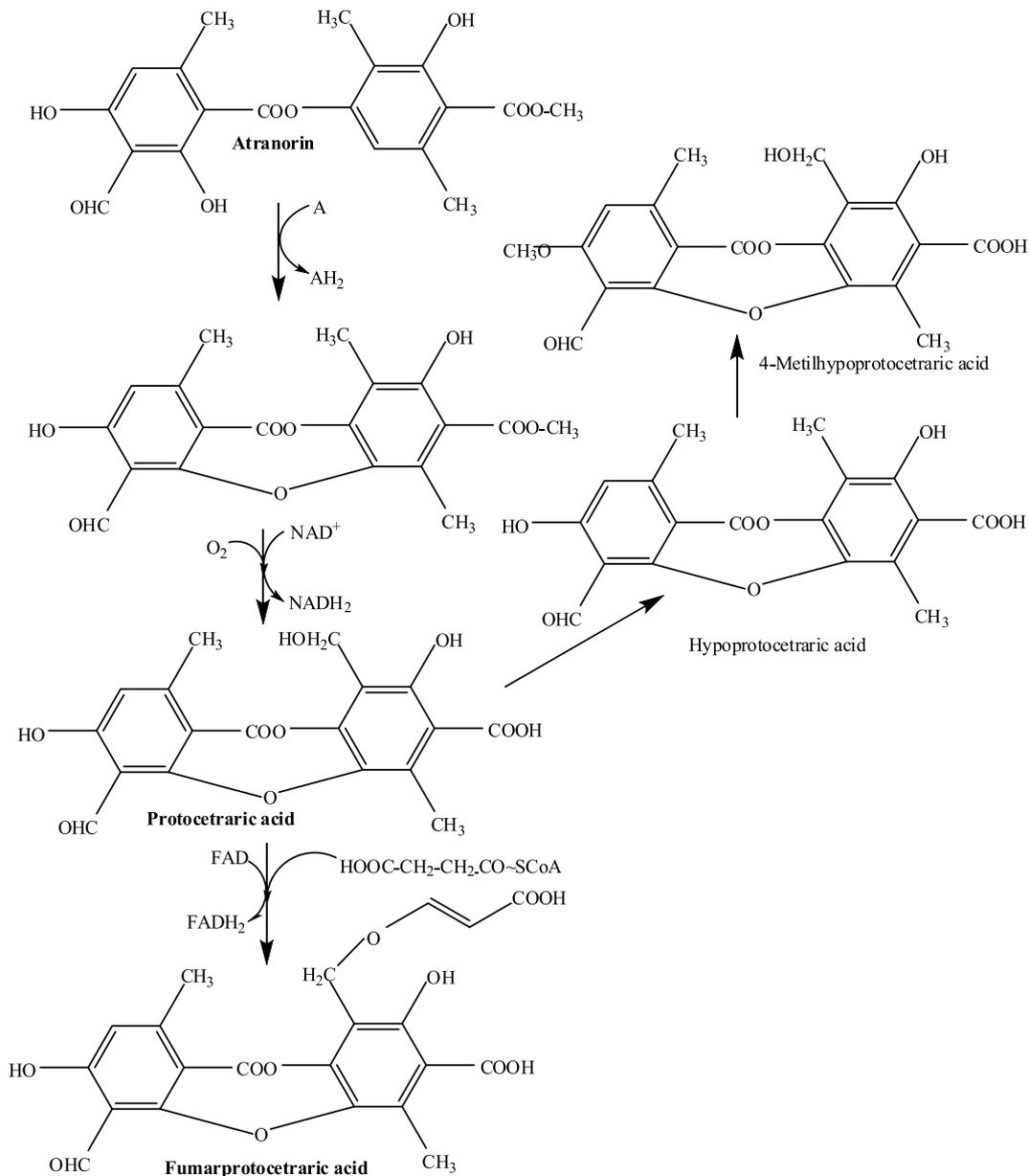


Fig. 1. Scheme showing chemical structure and proposed biosynthetic pathway of atranorin-derived depsidones in the lichen *Cladonia verticillaris*.

2. Material and methods

2.1. Plant material

C. verticillaris (Raddi) Fr., an endemic lichen species of the Brazilian littoral and of the tabuleiros of the interior of the north-east of Brazil, was used throughout this work. Lichens grow on quartzarenic neosols that have low content of organic matter, low capacity to retain water and nutrients, low cation exchange capacity, low base saturation, increased acidity with the depth, sandy texture, predominance of kaolinite in the clay fraction and a fragile, physical structure (Pacheco and Cantalice, 2011).

The samples were collected in the foothills of Serra da Prata, 20 km to the north of the municipality of Saloá (8° 57' 5" S, 36° 43' 22" W), to 273 km from Recife, in an open field at 10 km east from the road PE 223. Thalli were harvested from a unique plot of 5 m², continuously exposed to sunshine without shade of any vegetation. We chose those specimens that had developed seven whorls and stored them in paper boxes at 20 °C ± 2 °C, in the dark, until required. All the samples were collected from a unique environment to avoid changes in the concentration of bioactive compounds derived from the different soils or exposure degrees.

The material was identified and the voucher specimen deposited in the Herbarium UFP of the Department of Botany of Pernambuco's Federal University, with the record number 52.299. *Parmotrema dilatatum* (Vainio) Pulls, used for the extraction of protocetraric acid (PRO), was collected at the same place, its record number being 39.893. Lettuce seeds (*L. sativa* L.) var. Grand Rapids alpha, 99.9% of purity (lot 28371) of Island PRO, Brazil, was acquired in commercial form.

2.2. Extraction of lichen substances

Dry lichen thalli were softened with distilled water for 5 min, powdered in a Sorvall Omni-Mixer 17-106 (Dupont Instruments Corp., Salt Lake City, Utah, USA), and immediately submitted to extraction in a device Soxhlet (Sobereign, VWR Co., Pennsylvania, USA) with pure acetone (Fisher Scientific, Madrid, Spain) at 56 °C for 1 day. A total of 2 L of solvent were used to extract 150 g of lichen material. After the extraction, acetonic solution was filtered through filter paper and evaporated to dryness in a concentrating SC250 Express speedvac (Thermo Electron Corporation, Asheville, NC, United Kingdom). Dry acetonic extract (AE) was re-suspended in the mobile phase used for HPLC analysis or, alternatively, used in germination experiments as described by Tigre et al. (2012). Solid lichen debris was new and successively extracted with methanol (at 65 °C), chloroform (at 62 °C) and diethyl ether (at 35 °C) in the same way, obtaining then methanolic (ME), chloroformic (CE), and ether extracts (EE), respectively. The same procedure was applied to extract lichen phenolics from lettuce roots.

2.3. Separation and quantification of lichen phenolics

The separation and quantification of the lichen phenolics were carried out by RP-HPLC by using a Spectra Physics 8810 (Thermo Electron Corporation, Asheville, NC, USA) liquid chromatograph equipped with a SP 8810 pump, a Rheodine injector, a UV SP8490 detector and DateApex Clarity Lawsuit™ for Windows (DateApex Ltd., Praha, Czech Republic) program for obtaining and integrating information. The different residues obtained by successive extractions were dissolved in mobile phase to be injected. Analysis conditions were: column, reverse phase (RP) Mediterranean sea C18 of Teknokroma, S.C.L., Spain; length, 120 mm; i.d., 4.6 mm; pd, 5 µm; pressure in column, 70 bar; mobile phase [acetonitrile]: [acetonitrile: 4% acetic acid in water Mili-Q (80:20, v/v)] [70:30, v/v]; flux rate, 1.0 mL min⁻¹ isocratically; injection volume: 20 µL; temperature: 22 °C ± 0.1 °C; wavelength of analysis: 254 nm; range of detector (absorbance units at full scale): 0.0005 units (Santiago et al., 2008).

Following the protocol of Santiago et al. (2008), the quantification of atranorin and both fumarprotocetraric and protocetraric acids was carried out by means of the interpolation of the response of the detector, in area counts, in the calibrated, corresponding straight line. The above mentioned line was constructed for each one of the lichen phenols, calculating the relation between obtained area counts from increasing concentrations of every phenolic acid (between 290 and 400 µg mL⁻¹ for fumarprotocetraric acid, 10–500 µg mL⁻¹ for protocetraric acid and 30–400 µg mL⁻¹ for atranorin). Protocetraric acid was purified from *P. dilatatum* thalli (Vain.) and fumarprotocetraric acid and atranorin from *C. verticillaris* thallus in the Laboratory of Natural Products of the Department of Biochemistry of Pernambuco's Federal University, Recife, Brazil.

2.4. Bioassay of (pre-emergent) germination

The experiment was achieved in 9 cm in diameter sterilized Petri dishes, lined in its bottom by two leaves of filter paper, and maintained in a chamber by a photoperiod of 12 h, at 22 °C ± 0.2 and relative humidity of 75%. The filter paper was moistened with 6.0 mL, 2.5 mg mL⁻¹, of an aqueous solution of all the phenols extracted by the different organic solvents (AE, ME, CE or EE). Once the solvent evaporated in air flow, the filter papers were newly moistened with 6.0 mL of distilled water. As a control, dishes moistened with distilled water were used. In every Petri dish, 50 seeds of *L. sativa* were deposited on the filter paper with four replications. After 10 day germination, roots and leaves were used for transmission microscopy analysis.

2.5. Transmission electron microscopy

Roots and leaves of *L. sativa* seedlings, 10 days old, growing in the described conditions, were fixed in Millonig buffer, pH 7.3 (Millonig, 1961), containing 2.5% (v/v) glutaraldehyde and 16% (v/v) *p*-formaldehyde during 6 h at 4 °C, washed with the same buffer and post-fixed in a mixture of 1% (w/v) osmium tetroxide and 3% (w/v) potassium ferricyanide (1:1 v/v) during 2 h. Later, tissues were dehydrated in a series of aqueous acetone solutions from 30% to 100% (v/v), by maintaining the samples immersed in those for 30 min. Finally, the samples were absorbed in Epon-812 resin for 3 days at 70 °C. Ultra-thin sections (600 Å), obtained with an ultramicrotome OmU-2Reichert-Jung (Wien, Austria), were examined with a transmission electron microscope Jeol 1010 (Tokyo, Japan), according to Legaz et al. (2004).

2.6. Biometric measurements and statistical analysis

Forty lettuce seedlings 10 days old, growing in acetonic extract were used for biometric measurements consisting of the main root length and leaf area. Statistical analysis was performed using the multiple ANOVA test followed by post hoc analysis with Tukey's honestly significant difference test. Differences were considered to be significant at *P* < 0.05.

3. Results

3.1. Lichen phenolics and plant growth

HPLC analysis of the different lichen extracts revealed that fumarprotocetraric acid is the main component of the phenolic fraction (52.2% of the total phenols) whereas atranorin accumulated in a very low amount (2.8% of total phenolics). In the sequence of extraction of lichen phenolics using acetone–methanol–chloroform–diethyl ether, acetone extracted 71% of total protocetraric acid, 33.7% of fumarprotocetraric acid and 10% total atranorin, whereas methanol extracted 14.7%, 31.8% and 54.5% of these three compounds (Table 1). Anyway, both depsidones, protocetraric and fumarprotocetraric acids, were always the main components of the extracted mixtures.

Seed germination and plant growth on different lichen extracts resulted in an enhanced elongation of the main root and a restriction of leaf area, as shown in Table 2. Since the acetone extract contained about 50% of total phenolics extracted by successive treatments, the uptake of these phenolics was assayed by HPLC in acetonitrile extracts of lettuce roots. Plant tissue, after 10 days of plant growth, contained 0.206 mg of total phenolics, this is about 1.4% of total phenolics provided to the seedlings. The main phenolic found in root tissues was protocatechic acid (132.6 µg), the most polar compound in the mixture, followed by fumarprotocatechic acid (72.6 µg). In other words, the uptake of phenolics from the media seemed to be favored by the polarity of the molecule. This inclines us to think that the enhanced growth of the main root could be due to the action of protocatechic acid although the occurrence of fumarprotocatechic acid in root tissues was significant.

3.2. Changes of root ultrastructure produced by lichen acids

Fig. 2 shows a longitudinal cut of the apical end of a control lettuce root in which its cylindrical form and the transparent calyptra (A) can be appreciated. The apical end of the calyptra was composed of three or four layers of cells of prismatic shape (B) and big nuclei (C) whereas in the underlying cells, a great amount of perinuclear or perivacuolar statoliths can be observed (D). The subapical parenchyma was formed by multipolar cells, similar in shape to the pavement cells of leaf epidermis, with numerous interdigitated-shaped lobes and a great amount of indentations (E), typical of this zone of root tissue, as well as epidermal cells, developing a high activity in the production of auxin (Li et al., 2011).

Logically, the same vision of parenchymatous cells with numerous lobes and indentations was obtained in the cross sections of the root (Fig. 3A), in which the central zone of the cell was occupied by an enormous vacuole that displaced the ergastoplasm to a perimetral location where clear storage bodies can be observed (Fig. 3B).

Germination of lettuce seeds in media that contain AE of *C. verticillaris* (2.5 mg mL⁻¹) produced plants whose roots strongly elongated showing diverse cellular alterations. The cells of the calyptra were flattened, tending to compensate for their minor length with a major width (Fig. 4A and D), whereas the submeristemal cells drastically diminished their indentation pattern (Fig. 4B) and retained well defined mitochondria (Fig. 4C). Many of the cells were in an active process of cellular division and elongation (Fig. 4D) and their endoplasmic reticulum was complicated and wrapped, forming elliptical structures (Fig. 4E). A valuable number of dictyosomes were also observed, Golgi's complexes with bladders TGN (1 in Fig. 4F) perfectly differentiated, that break off from the membranous complex and moved towards the cellular membrane (2, in Fig. 4F) crossing it by inverse pinocytosis and going on to the periplasmic space (3 in Fig. 4F), where they spilled their content of hemicelluloses and pectins. This spillage of the vesicular content would promote the enlargement of the cell wall for apposition and intussusception of new materials of wall.

Table 1
Sequential extraction of phenolics from *Cladonia verticillaris* thalli with different organic solvents.

Extract	ϵ'_{0a}	Protocatechic acid (µg mL ⁻¹)	Fumarprotocatechic acid (µg mL ⁻¹)	Atranorin (µg mL ⁻¹)	Total (µg mL ⁻¹)
Acetone	0.56	22.10 ± 2.31	12.11 ± 1.07	0.19 ± 0.02	34.39
Methanol	0.95	4.55 ± 0.51	11.26 ± 1.13	1.05 ± 0.09	16.86
Chloroform	0.40	1.02 ± 0.07	4.26 ± 0.14	0.61 ± 0.04	5.89
Diethyl ether	0.38	3.30 ± 0.28	8.31 ± 0.55	0.09 ± 0.01	11.7
Total		30.97	35.94	1.94	68.84

^a Eluotropic force coefficient.

Table 2

Main root length and leaf area of lettuce seedlings grown for 10 days in 2.5 mg mL⁻¹ acetonitrile extract. Values are the mean of 40 replicates ± standard error. Different letters indicate significant differences (P < 0.05).

Treatment	Main root length (mm)	Leaf area (mm ²)
Control	36.28 ± 2.89 c	16.49 ± 1.74 a
AE	77.82 ± 6.32 a	11.98 ± 1.44 b
ME	54.91 ± 4.91 b	6.69 ± 1.03 c
CE	56.24 ± 5.27 b	12.79 ± 1.62 b
EE	55.41 ± 4.93 b	8.65 ± 2.89 b,c

3.3. Ultrastructure of lettuce leaves

The capture of lichen phenols by the root and their transport towards the leaves modified the pigment composition and the photosynthetic capacity of chloroplasts (Tigre, 2014). Thus, structural alterations of the mesophyll could be expected. As was observed in Fig. 5, the leaves of the control plants (without addition of lichen phenolics), possessed an epidermis of well-differentiated cells and abundant spongy parenchyma, typical of C3 plants, the cells of which showed chloroplasts peripherally aligned in the limit of the cytoplasm, near the internal face of the cell membrane (Fig. 5A, B and C). They possessed also abundant mitochondria perfectly structured in mitochondrial cristae, and big vacuoles (Fig. 5D). Chloroplasts showed a lenticular shape, with abundant grana and intergrana lamellae (Fig. 5E), as well as numerous lipidic bodies, very dense to the electrons (Fig. 5F).

Germination of the lettuce seeds and the seedling growth on media containing lichen phenols reduced in a great manner the volume of empty spaces in the spongy parenchyma, though it supported the chloroplasts in their perimetral position (Fig. 6A). Nevertheless, the ultrastructure of these chloroplasts presented significant differences with regard to that of the plant control. Their grana were becoming deformed progressively (Fig. 6B), though it was not a generalized fact for all of them, at least during the chosen time of plant growth (Fig. 6C). The mitochondria progressively altered their structure of internal cristae (Fig. 6C and E) and the grana of the most degenerate chloroplasts finally appeared as semidense bodies without the internal thylacoid structure observed during the first phases of their structural changes (Fig. 6D). These modifications were in agreement with the loss of their photochemical activity, demonstrated by means of the study of the photochemical capacity of the PSII (data not shown).

Seedlings 10 days old growing on ME of *C. verticillaris* showed few ultrastructural variations at root level with respect to variations described for those that grew in acetonitrile extracts (Fig. 7). The parenchymatous cells possessed few lobes and scanty indentations (Fig. 7A), and their endoplasmic reticulum showed a certain degree of disorganization (Fig. 7B). In leaves, no significant alterations in many chloroplasts occurred (Fig. 7C), though a minor number of grana was appreciated in anyone of them (Fig. 7D).

In other cases, nevertheless, chloroplasts suffered an extreme disorganization, with formation of big central, amorphous spaces that, after increasing in size, displaced the residual grana towards the periphery of the organelle (Fig. 7E). In some cases, lipidic globules very dense to

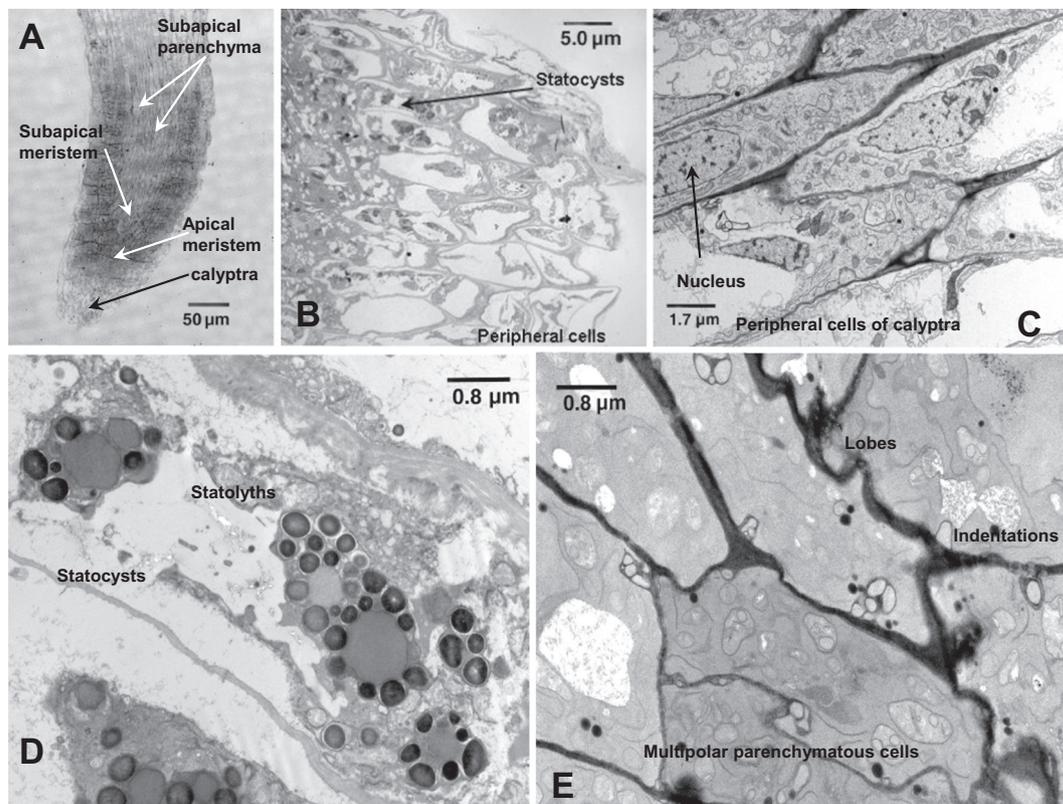


Fig. 2. Transmission electron micrographs of longitudinal sections of *L. sativa* roots from control seeds, germinated and grown in absence of phenols of *C. verticillaris*. A) Apical segment of the root where the calyptra and both apical and subapical meristems can be appreciated. B) Magnification of the outer calyptra showing the two main types of cells that compose the organ, the peripheral cells and the statocysts. C) Peripheral cells of the calyptra. D) Cells of the calyptra (statocysts) showing the starchy statolyths. E) Cells of the subapical parenchyma of the root showing interfinger-shaped lobes and indentations.

the electrons appeared and packages of grana were broken off and separated from their previous organized structure (Fig. 7G and I). In the cytoplasm, a great central vacuole was formed and appeared well defined mitochondria (Fig. 7F). In other cases, plasmodesmata between two neighboring cells appeared to be literally plugged by an amorphous material (Fig. 7H).

Growth of lettuce seedlings on CE presents, as more notable differences with regard to the already described above, the occurrence of cisterns of the Golgi system in the cytoplasm (Fig. 8A), a highly folded endoplasmic reticulum (Fig. 8B), disappearance of intergranular lamellae in altered chloroplasts of spongy parenchyma (Fig. 8D) and, finally, isolated packages of thylakoid membranes pushed towards the periphery of the stroma by the development of an amorphous central body

(Fig. 8E), similar to that described for seedlings growing on ME. However, the chloroplast ultrastructure was preserved in some spongy parenchymatous cells (Fig. 8C).

The loss of intergranular lamellae was also observed in plants growing on phenolics extracted with diethyl ether (Fig. 9B), whereas the internal structure of mitochondria remained unaffected (Fig. 9B and C). In a more advanced degree of modification, the thylakoid packages were fusing in an extensive accumulation of lipids without internal structure, very dense to the electrons (Fig. 9C), reason for which these bodies could not be interpreted as starch grains. Membranes of endoplasmic reticulum suffered a rearrangement by acquiring a spiral form (Fig. 9D), whereas occlusive cells and epidermis did not suffer noticeable alterations (Fig. 9A).

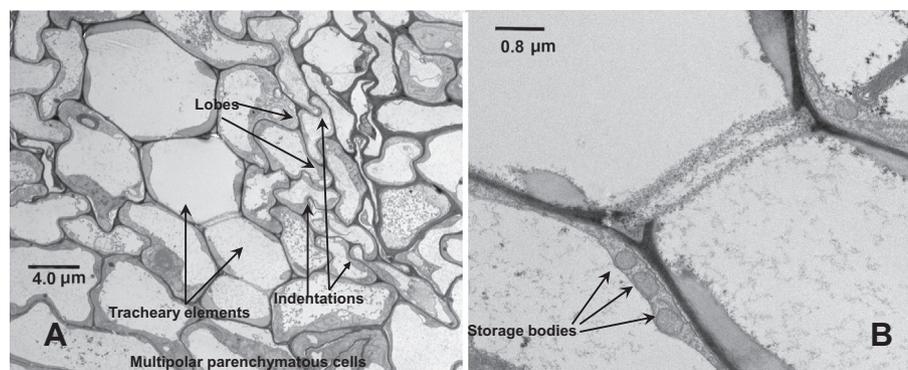


Fig. 3. Transmission electron micrographs of cross sections of roots of *L. sativa* from seed control, germinated and grown in absence of phenols of *C. verticillaris*. A) Parenchymatous cells in the subapical parenchyma of the root showing interfinger-shaped lobes and indentations. B) Magnification of the connection zone between two tracheary elements.

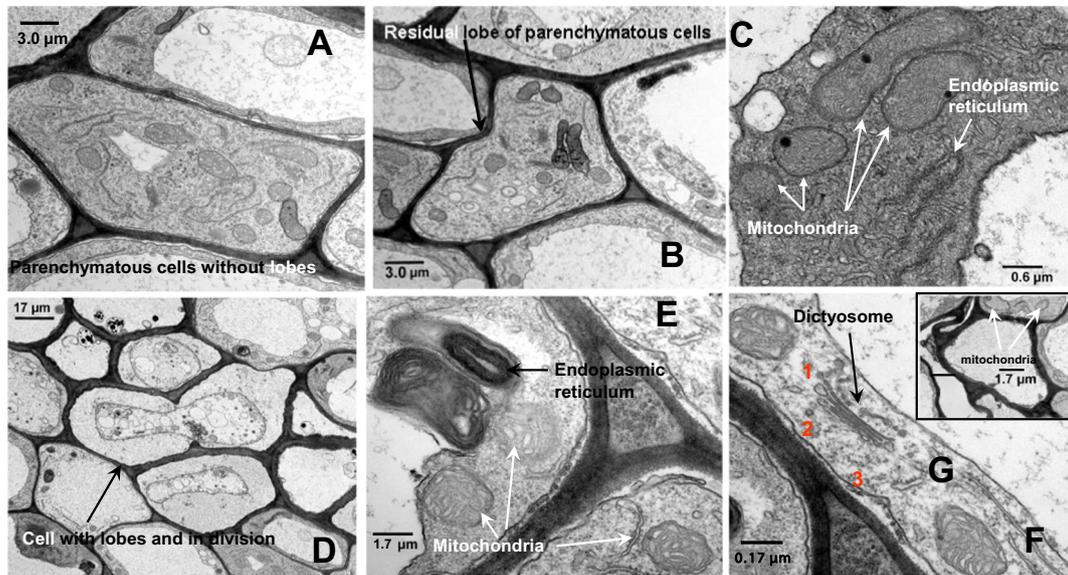


Fig. 4. Transmission electron micrographs of cross sections of roots of *L. sativa* from seeds germinated and grown in the presence of *C. verticillaris* phenols (2.5 mg mL^{-1}) extracted with acetone. A and B) Zone of the subapical parenchyma showing cells that have lost their ability to form lobes and indentations. C) Magnification of a root parenchymatous cell showing mitochondria and part of the endoplasmic reticulum. D) Parenchymatous cell in division after losing its capacity of indentation. E) Detail of mitochondria and endoplasmic reticulum highly folded in root parenchymatous cell. F) Detail of the peripheral cytoplasm showing a dictyosome and the sequence of traffic of the TGN vesicles towards the plasmatic membrane. Numbers 1, 2 and 3 indicate the sequence of pinocytosis towards the periplasmic space. G) Magnification of a cytoplasmic zone showing mitochondria.

4. Discussion

In a previous paper, Tigre et al. (2012) described that different organic extracts from the lichen *C. verticillaris* accelerate root elongation and diminish the leaf area of 10 day-old lettuce seedlings and that such effects could be attributable to the presence of two depsidones, protocetraric and fumarprotocetraric acids biosynthetically related, in the different extracts. These facts have been confirmed herein (Table 2).

The extraction of lichen thalli has been carried out in a serial way with acetone, methanol, chloroform and diethyl ether. In all cases, the pair protocetraric/fumarprotocetraric acids are the main extracted

phenolics, as shown in Table 1. The first two treatments with acetone and methanol extract about 75% of both compounds accumulated in the lichen thalli. Nevertheless, the amount of atranorin extracted with both solvents only represents about 1.8% of total extracted phenolics. Thus, it seems to be probable that the effects of *C. verticillaris* phenols in lettuce ultrastructure can be mainly due to the action of the depsidone pair. Although many phenolics from higher plants, mainly flavonoids, act as inhibitors of auxin transport, then inhibiting cell elongation (Brown et al., 2014), many other phenolics, mainly those derived from benzoic acid (Ferro et al., 2007) or those related to lignin precursors and catabolites, act as auxin-like molecules (Zandonadi

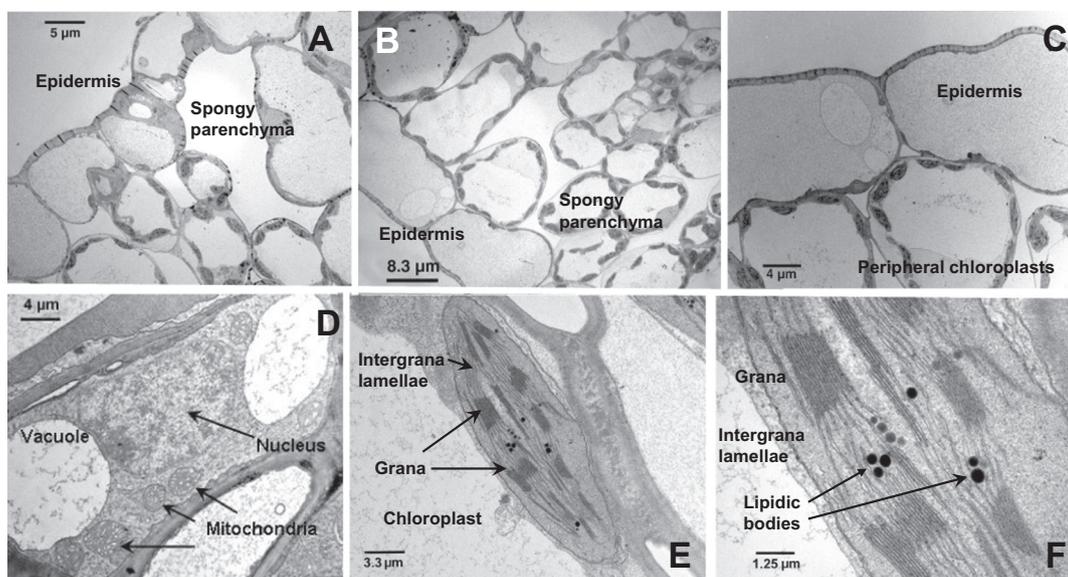


Fig. 5. Transmission electron micrographs of cross sections of leaves of *L. sativa* seedlings from control seeds, germinated and growing in absence of phenols of *C. verticillaris*. A) Epidermis and spongy parenchyma. B) A different zone of the same tissue showing the peripheral disposition of chloroplasts. C) Magnification of two epidermal cells and some cells of the spongy underlying parenchyma. D) Mitochondria and vacuoles of epidermal cells. E) Chloroplast of a cell from the palisade parenchyma. F) Magnification of the chloroplast, showing intergranal lamellae, grana and lipidic bodies.

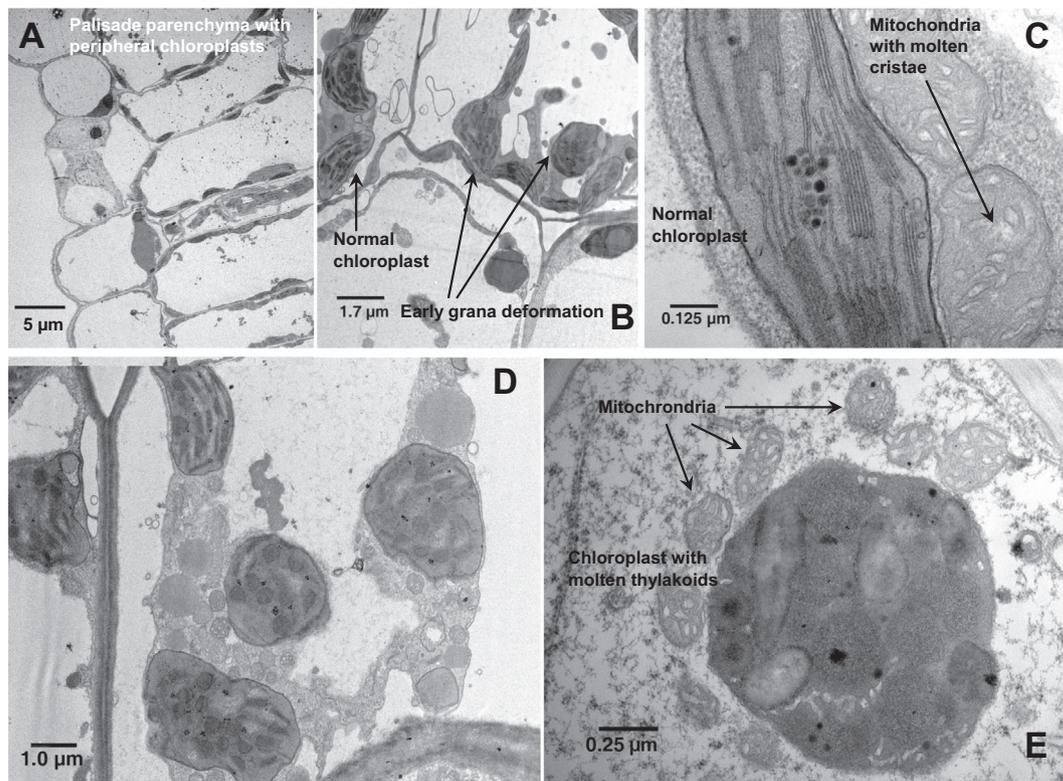


Fig. 6. Transmission electron micrographs of cross sections of leaves of *L. sativa* seedlings from seeds germinated and grown in the presence of *C. verticillaris* phenols (2.5 mg mL^{-1}) extracted with acetone. A) Palisade parenchyma. B) Early deformation of chloroplasts of the palisade parenchymatous cells by action of *C. verticillaris* phenols absorbed by the root and translocated up to the leaves. C) Magnification of a still not modified chloroplast and of mitochondria that have eliminated their internal combs. D) Altered chloroplasts in those who eliminate the intergranal membranes have been eliminated and the grana fuse to form amorphous lipidic bodies in the stroma of the chloroplast. E) Magnification of a degenerated chloroplast.

et al., 2010), directly or by inhibition of IAA-oxidases (Jansen et al., 2014). In fact, many lichen phenolics exhibit antioxidant activities (Kosanić et al., 2011). Fumarprotocetraric and protocetraric acids show some structural analogy with phenylpropanoids and this must be the basis of the increasing root elongation shown in Table 2. On the other hand, the roots of lettuce not only increased in length after the uptake of depsidones, but also increased their content in water and, therefore, the turgor pressure of their cells, which would be translated in higher elongation values. For these reasons, ultrastructural changes that lettuce seedlings suffer when they grow in similar extracts, containing both depsidones, have been searched in order to explain the physiological changes mentioned above.

The accelerated growth of roots, shown in Table 2, can be related to an increase of the cell volume that practically eliminates the lobes and notably diminish the number of indentations of parenchymatous cells of the root, mainly in the zone of the subapical meristem, for seedlings growing in acetone extracts of *C. verticillaris* (compare Figs. 2 and 4). These signs of active growth, derived from an increased swelling of cells, are accompanied by a significant quantity of dictyosomes (Fig. 3). Conserved mitochondria could maintain sufficient energy to support a major rate of growth whereas the Golgi system would assure a constant production of cell wall materials. The appearance of dictyosomes, with TGN vesicles loaded with polysaccharides that separate Golgi's membrane systems and emigrate across the cytoplasm (Fig. 4C and F) are in agreement with that described by Worden et al. (2012) for the synthesis and deposition of new cell wall components. More active mitochondria imply major energetic availability for accelerated cell elongation. The TGN vesicles not only contain diverse hemicelluloses and pectins, but also molecules for signaling for the activation of

the cellulose synthase complexes, as described by Xiong et al. (2010) for rice seedlings. On the other hand, the decrease in the leaf area, described by Tigre et al. (2012), can be correlated directly to the role of lichen phenolics as powerful inhibitors of chlorophyll biosynthesis (Romagni et al., 2000) and of the photochemical activity of the photosystem II (Takahagi et al., 2006), as well as chlorophyllase activators (Bouaid and Vicente, 1998a), which would result in a significant loss of the photosynthetic ability.

These effects are supported by experimental evidences derived from studies about the internalization of lichen phenols into the xylem (Legaz et al., 1988; Bouaid and Vicente, 1998b), their transport towards the leaves (Avalos et al., 1986; Bouaid and Vicente, 1998b) and their permeation across the chloroplast membrane (Bouaid and Vicente, 1998c), fundamentally achieved for epiphytic lichens on their phytophores. However, quantitation of lichen phenolics in lettuce leaves has not been achieved as yet due to the extreme complexity of leaf extracts. Thus, it is necessary to develop new protocols for cleaning the samples and for the separation of components.

In effect, lettuce seedlings grown for 10 days in acetonic extracts of *C. verticillaris*, containing high amounts of both protocetraric and fumarprotocetraric acids, show normal chloroplasts (Fig. 6A and B) and some few ones in which the beginning of lamellar deformation becomes visible (Fig. 6B) as well as a progressive melting of the grana up to turning into a vesicular system slightly dense to the electrons (Fig. 6D and E).

It is not easy to explain the effect of lichen phenols in the degradation of the membrane chloroplastic systems, although it is significant that ME, CE and EE cause some different effects on lettuce chloroplast ultrastructure (Figs. 7–9) perhaps because the amount of fumarprotocetraric acid

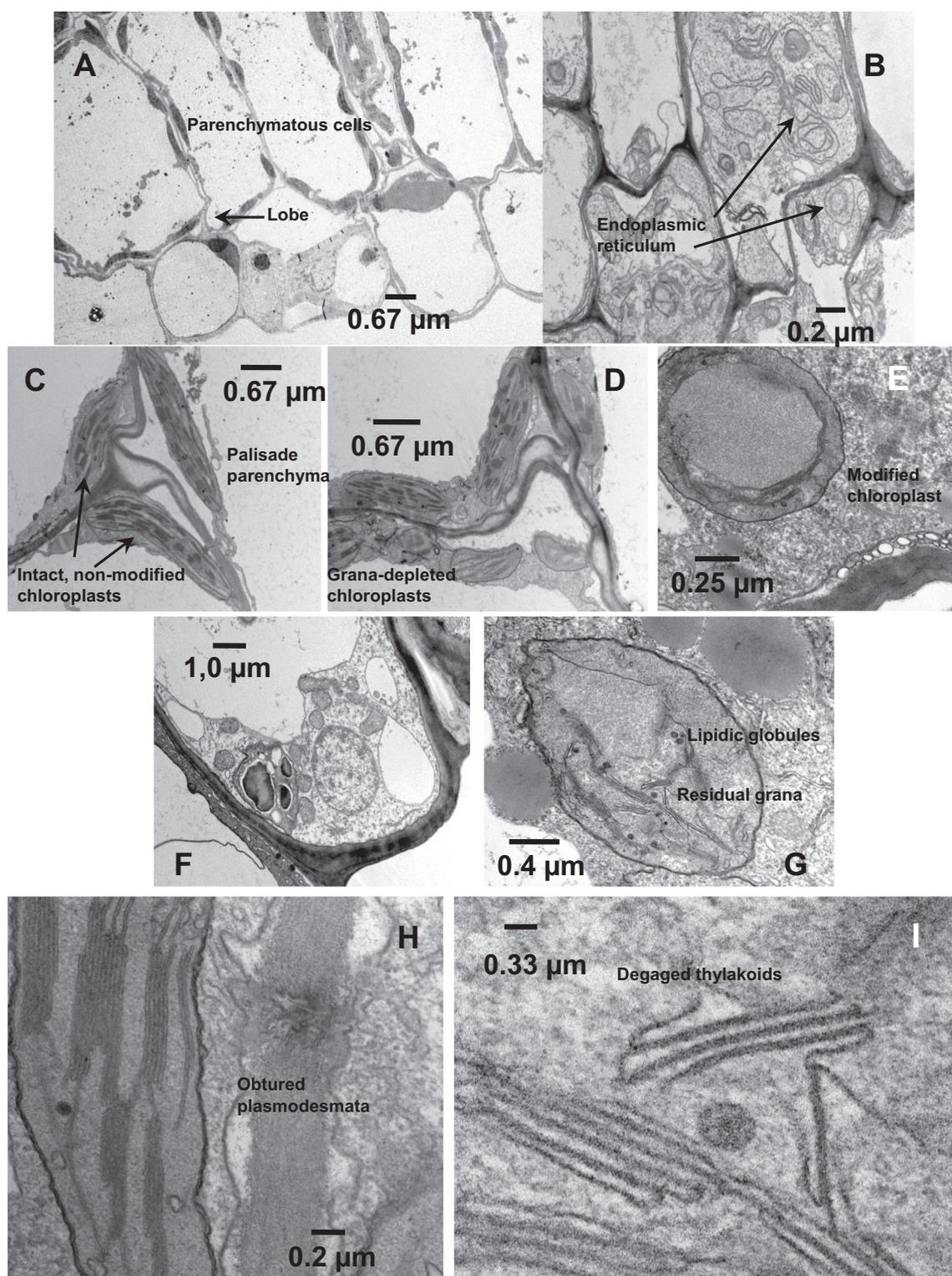


Fig. 7. Cross sections of roots (A and B) and leaves (C to I) of *L. sativa* seedlings growing in methanolic extract of *C. verticillaris* ($2.5 \text{ mg phenols mL}^{-1}$). A) Parenchymatous, turgent cells of a root showing loss of both lobes and indentations. B) Endoplasmic reticulum of the same cells. C) Cells of palisade leaf parenchyma showing intact, non-altered chloroplasts. D) Cells of palisade leaf parenchyma showing grana-depleted chloroplasts. E) Highly modified chloroplast showing a great central body and residual grana displaced to the periphery of the organelle. F) Epidermal cell showing the nucleus and numerous mitochondria. G) Highly degraded chloroplast from palisade parenchyma cell. H) A plasmodesmata connecting two neighboring cells and occluded by unidentified material. I) Degaged thylakoids from grana of a degraded chloroplast.

in these extracts is higher than that found in AE but the above mentioned phenols do not act as substrates of peroxidases (Liers et al., 2011), laccases (Laufer et al., 2006) or lipo-oxygenases (Beckett et al., 2013). On the contrary, lichen phenols have been described as powerful antioxidants (Kranmer and Birtić, 2005) by acting as scavenger agents on ROS

species (Pavithra et al., 2013). Many phenols of plants also behave as lipase inhibitors (Batubara et al., 2009). For all these reasons, it would be necessary to think of an interaction between phenols and membrane lipids that would produce the observed lamellar malformations rather than in an activation of degradative enzyme systems.

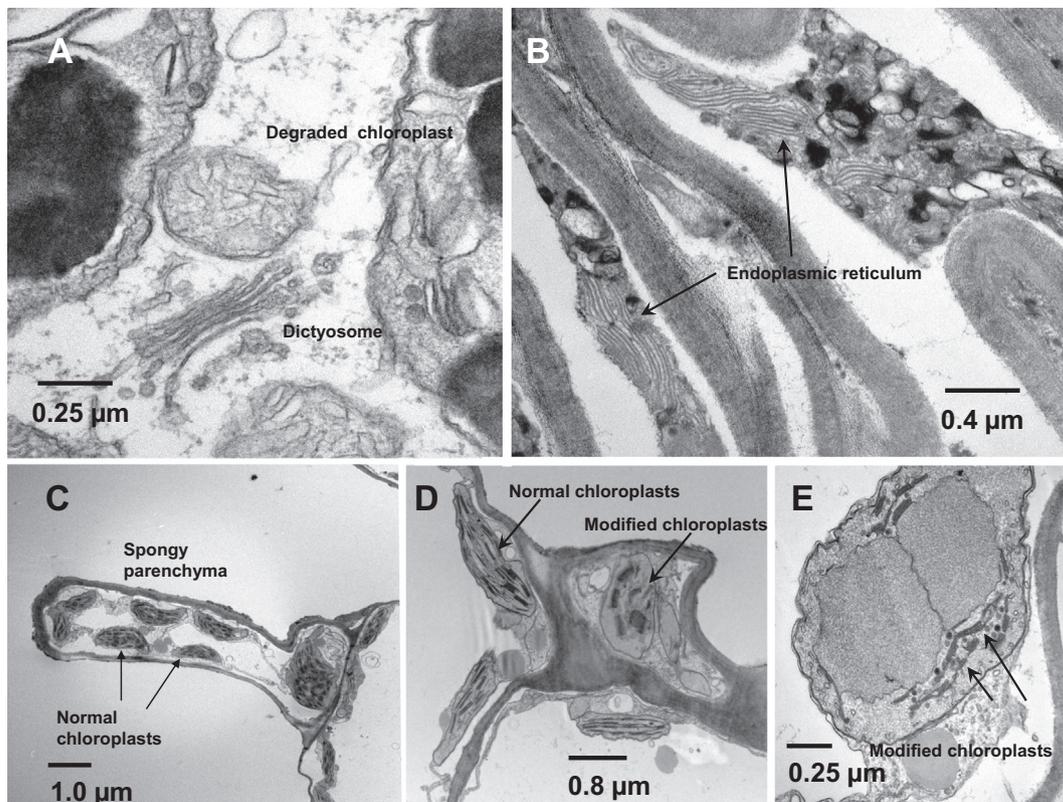


Fig. 8. Cross sections of leaves of *L. sativa* seedlings growing in chloroformic extract of *C. verticillaris* ($2.5 \text{ mg phenols mL}^{-1}$). A) Palisade parenchymatous cell showing active dictyosome, mitochondria and a degraded chloroplast. B) Endoplasmic reticulum of the same cells. C) Cells of spongy leaf parenchyma showing intact, non-altered chloroplasts. D) Cells of palisade leaf parenchyma showing normal, unmodified chloroplasts as well as a chloroplast without intergranal lamellae. E) Highly modified chloroplast showing a great central body and residual grana displaced to the periphery of the organelle.

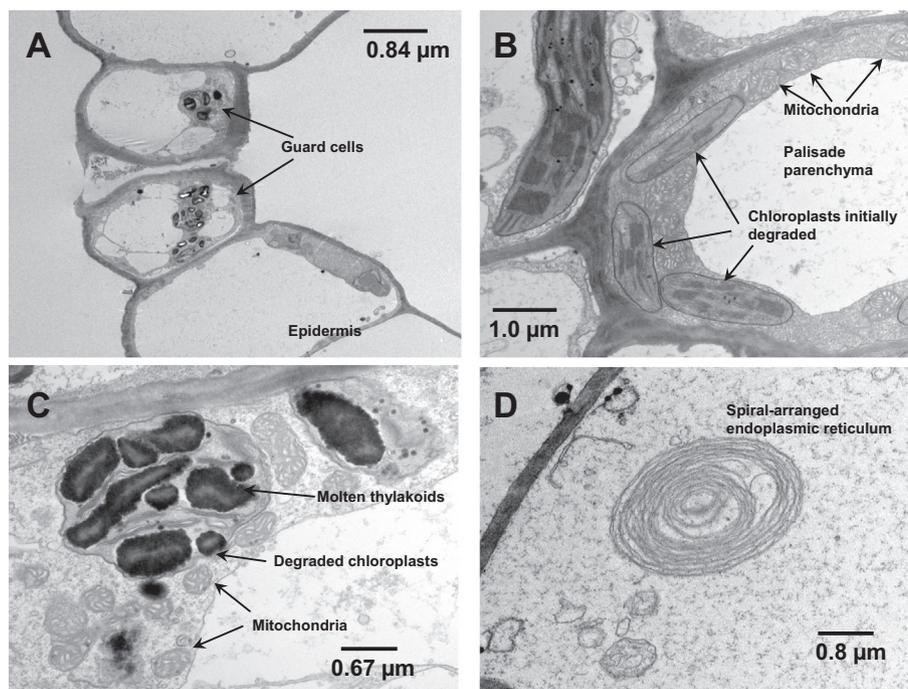


Fig. 9. Cross sections of leaves of *L. sativa* seedlings grown in diethyl ether extract of *C. verticillaris* ($2.5 \text{ mg phenols mL}^{-1}$). A) Leaf epidermis showing the guard cells of a stomata. B) Cells of palisade leaf parenchyma showing mitochondria chloroplasts without intergranal lamellae. C) Highly modified chloroplast showing several mitochondria and chloroplasts with melted thylakoids forming electron-dense, amorphous bodies. D) Palisade parenchymatous cell showing spiral-arranged endoplasmic reticulum.

5. Conclusions

The depsidone pair composed of protocetraric and fumarprotocetraric acids causes changes in the ultrastructure of both roots and leaves of lettuce seedlings. Whereas these phenolics accelerate the growth in length of roots, which is accompanied by cell division, an increase of the volume of cells and in the number of active dictyosomes, they strongly altered and degraded chloroplast ultrastructure of both spongy and palisade leaf parenchyma. This implies that *C. verticillaris* depsidones can be considered as potential and powerful bioherbicides.

Acknowledgments

R.C. Tigre and E.C. Pereira are grateful to the Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES, Brazil) and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) for the scholarships and fellowships granted. This work was supported by a grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), BFU2009-11983 to C. Vicente and M.E. Legaz.

References

- Avalos, A., Legaz, M.E., Vicente, C., 1986. The occurrence of lichen phenolics in the xylem sap of *Quercus pyrenaica*, their translocation to leaves and biological significance. *Biochemical Systematics and Ecology* 14, 381–384.
- Batubara, I., Mitsunaga, T., Ohashi, H., 2009. Screening antiacne potency of Indonesian medicinal plants: antibacterial, lipase inhibition, and antioxidant activities. *Journal of Wood Sciences* 55, 230–235.
- Beckett, R.P., Zavarzina, A.G., Liers, C., 2013. Oxidoreductases and cellulases in lichens: possible roles in lichen biology and soil organic matter turnover. *Fungal Biology* 117, 431–438.
- Bouaid, K., Vicente, C., 1998a. Chlorophyll degradation effected by lichen substances. *Annles Botanica Fennici* 35, 71–74.
- Bouaid, K., Vicente, C., 1998b. Annual variations of the occurrence of lichen phenolics from *Evernia prunastri* in the xylem sap of *Quercus rotundifolia*. *Sauteria* 9, 257–262.
- Bouaid, K., Vicente, C., 1998c. Effects of lichen phenolics on defoliation of *Quercus rotundifolia*. *Sauteria* 9, 229–236.
- Brown, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A.S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, L., Muday, G.K., 2014. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126, 524–535.
- Dayan, F.E., Owens, D.K., Duke, S.O., 2012. Rationale for a natural products approach to herbicide discovery. *Pest Management Science* 68, 519–528.
- Duke, S.O., Dayan, F.E., Rimando, A.M., Schader, K.K., Aliotta, Q., Oliva, A., Romagni, J.G., 2002. Chemicals from nature for weed management. *Weed Science* 50, 138–151.
- Endo, T., Takahagi, T., Kinoshita, Y., Yamamoto, Y., Sato, F., 1998. Inhibition of photosystem II of spinach by lichen-derived depsides. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 62, 2023–2027.
- Ferro, N., Bultinck, P., Gallegos, A., Jacobsen, H.J., Carbio-Dorca, R., Reinard, T., 2007. Unrevealed structural requirements for auxin-like molecules by theoretical and experimental evidences. *Phytochemistry* 68, 237–250.
- Fontaniella, B., Mateos, J.L., VICENTE, C., Legaz, M.E., 2001. Improvement of the analysis of dansylated derivatives of polyamines and their conjugates by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 919, 283–288.
- Jansen, M.A.K., van den Noort, R.E., Adilla-Tan, M.Y., Prinsen, E., Lagrimini, L.M., Thorneley, R.N.F., 2014. Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiology* 126, 1012–1023.
- Kosanić, M., Ranković, B., Vukojević, J., 2011. Antioxidant properties of some lichen species. *Journal of Food Science and Technology* 48, 584–590.
- Kranner, I., Birtič, S., 2005. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integrative and Comparative Biology* 45, 734–740.
- Kutney, J.P., Ebizuka, Y., Salisbury, P.J., Watt, C.K., Towers, G.H.N., 1978. An inducible hydrolase from *Mortierella isabellina* (basidiomycetes). The deacylation of (+)-usnic acid. *Phytochemistry* 17, 49–52.
- Kutney, J.P., Leman, J.D., Salisbury, P.J., Yee, T., 1984. Studies in the usnic acid series. IX. The biodegradation of (+)-usnic acid by *Mucor globosus*. *Canadian Journal of Chemistry* 62, 320–325.
- Lascève, G., Gaugain, F., 1990. Effects of usnic acid on sunflower and maize plantlets. *Journal of Plant Physiology* 136, 723–727.
- Latkowska, E., Lechowski, Z., Białczyk, J., Pilarski, J., 2006. Photosynthesis and water relations in tomato plants cultivated long-term in media containing (+)-usnic acid. *Journal of Chemical Ecology* 32, 2053–2066.
- Laufer, Z., Beckett, R.P., Minibayeva, F.V., 2006. Co-occurrence of the multicopper oxidases tyrosinase and laccase in lichens in sub-order Peltigerineae. *Annals of Botany* 98, 1035–1042.
- Lechowski, Z., Mejh, E., Białczyk, J., 2006. Accumulation of biomass and some macroelements in tomato plants grown in media with (+)-usnic acid. *Environmental and Experimental Botany* 56, 239–244.
- Legaz, M.E., Pérez-Urria, E., Avalos, A., Vicente, C., 1988. Epiphytic lichens inhibit the appearance of leaves in *Quercus pyrenaica*. *Biochemical Systematics and Ecology* 16, 253–259.
- Legaz, M.E., Monsó, M.A., Vicente, C., 2004. Harmful effects of epiphytic lichens on trees. *Recent Research Developments in Agricultural and Horticulture* 1, 1–10.
- Li, H., Lin, D., Dhonukshe, P., Nagawa, S., Chen, D., Friml, J., Scheres, B., Guo, H., Yang, Z., 2011. Phosphorylation switch modulates the interdigitated pattern of PIN1 localization and cell expansion in *Arabidopsis* leaf epidermis. *Cell Research* 21, 970–978.
- Liers, C., Ullrich, R., Hofrichter, M., Minibayeva, F.V., Beckett, R.P., 2011. A heme peroxidase of the ascomycetous lichen *Leptogium saturninum* oxidizes high-redox potential substrates. *Fungal Genetics and Biology* 48, 1139–1145.
- Millonig, G., 1961. Advantages of a phosphate buffer for OsO₄ solutions in fixation. *J. Appl. Physiol.* 32, 1637.
- Nieves, J.A., Acevedo, L.J., Valencia-Islas, N.A., Rojas, J.L., Dávila, R., 2011. Fitotoxicidad de extractos metanólicos de los líquenes *Everniastrum sorochelium*, *Usnea roccellina* y *Cladonia confusa*. *Galía* 4, 96.
- Nikolaev, T.N., Lapshin, P.V., Zavarzin, A.G., Zagoskin, N.V., 2014. The conjugates of phenolic acids in lichens of the order Lecanorales. *International Journal of Secondary Metabolite* 1, 15.
- Pacheco, E.P., Cantalice, J.R.B., 2011. Compressibility, penetration, resistance and least limiting water range of a yellow ultisol cultivated with sugarcane in the coastal tablelands of Alagoas State. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 35, 403–415.
- Pavithra, G.M., Vinayaka, K.S., Rakesh, K.N., Junaid, S., Dileep, N., Kekuda, P., Siddiqua, S., Naik, A.S., 2013. Antimicrobial and antioxidant activities of a macrolichen *Usnea pictoides*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3, 154–160.
- Romagni, J.G., Meazzab, G., Dhammika-Nanayakkarak, N.P., Dayan, F.E., 2000. The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Letters* 480, 301–305.
- Ruan, X., Li, Z.H., Wang, Q., Pan, C.D., Jiang, D.A., Wang, G.G., 2011. Autotoxicity and allelopathy of 3,4-dihydroxy-acetophenone isolated from *Picea schenkiana* needles. *Molecules* 16, 8874–8893.
- Santiago, R., de Armas, R., Legaz, M.E., Vicente, C., 2008. Separation from *Ustilago scitaminea* of different elicitors which modify the pattern of phenolic accumulation in sugarcane leaves. *Journal of Plant Pathology* 90, 87–96.
- Shao, H., Huang, X., Wei, X., Zhang, C., 2012. Phytotoxic effects and a phytotoxin from the invasive plant *Xanthium italicum*. *Molecules* 17, 4037–4046.
- Stark, S., Hyvärinen, M., 2003. Are phenolic leaching from lichen *Cladonia stellaris* sources of energy rather than allelopathic agent for soil microorganisms? *Soil Biology and Biochemistry* 35, 1381–1385.
- Takahagi, T., Ikezawa, N., Endo, T., Ifuku, K., Yamamoto, Y., Kinoshita, Y., Takeshita, S., Sato, F., 2006. Inhibition of PSII in atrazine-tolerant tobacco cells by barbatic acid, a lichen-derived depside. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 70, 266–268.
- Tigre, R.C., 2014. Investigação dos mecanismos de ação alelopática de *Cladonia verticillaris* sobre *Lactuca sativa* e *Solanum lycopersicum*. (PhD Dissertation). Department of Geographical Sciences, Federal University of Pernambuco, Brazil.
- Tigre, R.C., Silva, N.H., Santos, M.G., Honda, N.K., Falcão, E.P.S., Pereira, E.C., 2012. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 84, 125–132.
- Toledo, F.J., García, A., Estévez, F., Quintana, J., Bermejo, J., 2003. Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: phytotoxicity and antioxidative activity. *Journal of Chemical Ecology* 29, 2049–2071.
- Tsao, R., Romanchuk, F.E., Peterson, C.J., Coats, J.R., 2002. Plant growth regulatory effects and insecticidal activity of the extracts of the tree of heaven, *Ailanthus altissima*. *BMC Ecology* 2, 1–5.
- Vavasseur, A., Gautier, H., Thibaud, M.C., Lascève, G., 1991. Effects of usnic acid on the oxygen exchange properties of mesophyll cell protoplasts from *Commelina communis*. *Journal of Plant Physiology* 139, 90–94.
- Worden, N., Park, E., Drakakaki, G., 2012. Trans-Golgi network—an intersection of trafficking cell wall components. *Journal of Integrative Plant Biology* 54, 875–886.
- Xiong, G., Li, R., Qian, Q., Song, X., Liu, X., Yu, Y., Zeng, D., Wan, J., Li, J., Zhou, Y., 2010. The rice dynamin-related protein DRP2B mediates membrane trafficking, and thereby plays a critical role in secondary cell wall cellulose biosynthesis. *Plant Journal* 64, 56–70.
- Zagoskina, N.V., Nikolaev, T.N., Lapshin, P.V., Zavarzin, A.A., Zavarzin, A.G., 2013. Water-soluble phenolic compounds in lichens. *Microbiology* 82, 445–452.
- Zandonadi, D.B., Santos, M.P., Dobbss, L.B., Olivares, F.L., Canellas, L.P., Binzel, M.L., Okorocova-Façanha, A.L., Façanha, A.R., 2010. Nitric acid mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta* 231, 1025–1036.