



**POTENCIAL ALELOPÁTICO DO FRUTO E  
VARIABILIDADE DO CONTEÚDO DE DNA  
NUCLEAR DE *Annona crassiflora* Mart.**

**LAVRAS – MG  
2014**

**RAONI GWINNER**

**POTENCIAL ALELOPÁTICO DO FRUTO E VARIABILIDADE DO  
CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR DE *Annona crassiflora* Mart.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Moacir Pasqual

**LAVRAS - MG  
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Gwinner, Raoni.

Potencial alelopático do fruto e variabilidade do conteúdo de  
DNA nuclear de *Annona crassiflora* Mart./ Raoni Gwinner. – Lavras  
: UFLA, 2014.

99 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. Araticum - Alelopatia. 2. Citometria de fluxo. 3. Araticum -  
DNA nuclear - Variabilidade do conteúdo. 4. Plantas do cerrado. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.41

**RAONI GWINNER**

**POTENCIAL ALELOPÁTICO DO FRUTO E VARIABILIDADE DO  
CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR DE *Annona crassiflora* Mart.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 16 de dezembro de 2013

Dr. Juliano Lino Ferreira                      EMBRAPA

Dra. Leila Aparecida Salles Pio              UFLA

Dr. Moacir Pasqual

Orientador

**LAVRAS – MG  
2014**

*A Deus por me fazer superar todas as dificuldades e persistir*

### **AGRADEÇO**

*Ao meu orientador Moacir Pasqual pela liberdade e confiança depositada, aos pesquisadores Tesfahun e Juliano por tornarem possível a continuidade da formação científica de inúmeras pessoas, e a todos colaboradores que com conduta ética e profissional fizeram do ambiente de trabalho um local propício ao crescimento e desenvolvimento pessoal*

### **OFEREÇO**

*A minha mãe Lorna, meu irmão Pedro, minha avó Nellie e tia Vera pelo apoio e incentivo em todos meus projetos pessoais*

### **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Lorna, meu irmão Pedro, minha avó Nellie, tios Vera, Stanley e Kris, primos Joey e Becca e a todos os membros da família Gwinner que apesar de longe sempre torcem pelo meu sucesso.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao DAG (Departamento de Agricultura) e a Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de cursar uma pós-graduação.

Ao meu Orientador Moacir Pasqual pela confiança depositada.

Aos pesquisadores Juliano Lino e Tesfahun Setotaw pela imensurável apoio e incentivo.

Ao Professor Renato Mendes pela estrutura cedida à realização de parte deste trabalho.

A pesquisadora Héliida Magalhães e a agrônoma Flávia da Silveira pelo apoio nos momentos de necessidade e pela extrema competência e dedicação na realização dos trabalhos.

Ao pesquisador Filipe “Batata” pelo dinamismo e boa vontade nas inúmeras expedições ao Cerrado mineiro.

Ao Diego “Visconde” e sua tia Eliana pela recepção amistosa durante as coletas nos proporcionando a vivência do verdadeiro espírito sul mineiro.

A pesquisadora Leila Pio pelo conhecimento transmitido.

Aos laboratoristas Vantuil e Claret, pela orientação nos procedimentos de laboratório e momentos de descontração do dia a dia.

A Marli pela competência e rapidez nas muitas vezes em que me ajudou e instruiu.

Um agradecimento especial a minha namorada Thamiris pelo companheirismo, compreensão e pelos muitos momentos felizes vividos.

Ao Vinícius “Russo” pelas risadas cotidianas e Dirceu pelos valiosos ensinamentos.

Aos demais membros do Necult: Fabrício, Penoni, Renata, Suelen, Raoni, Camila, Luciana, Raíssa, Adalvan, Irton, Bárbara, Mirielle, Joyce e Gabriellen.

A todos aqueles que de alguma forma ajudaram a realização deste trabalho

A todos os companheiros do curso de pós graduação em Agronomia/Fitotecnia.

## RESUMO GERAL

O marolo (*Annona crassiflora* Mart.) é uma espécie endêmica do Cerrado que passa por um processo contínuo de redução populacional, congruente com a redução das dimensões de seu bioma. Esta espécie apresenta diversos potenciais de uso, portanto faz-se necessário o direcionamento de esforços para a conservação deste recurso genético. Ao se encontrar o potencial de uso de uma espécie, favorece-se sua utilização, e conseqüentemente, sua conservação. Neste trabalho, buscou-se a detecção do potencial alelopático e a avaliação da variabilidade do conteúdo de DNA nuclear de populações de marolo localizadas em Minas Gerais. Primeiro, estudou-se a alelopatia por meio da utilização de extratos vegetais, utilizando diferentes partes do fruto e solventes com diferentes polaridades. Tais extratos foram avaliados pelas respostas biológicas de três espécies bioindicadoras (alface, brócolis e tomate) quando expostas aos mesmos. As partes do fruto apresentaram potencial alelopático, especialmente o embrião com endosperma em meio de acetato de etila que apresentou efeito inibitório expressivo sobre sementes de alface e brócolis, e o extrato metanólico da casca que apresentou efeito inibitório sobre o tomate. A análise dos extratos por meio de espectrometria de massas por ionização por electrospray (ESI-MS) revelou que as partes do fruto de marolo são ricas em compostos bioativos possibilitando a identificação de aleloquímicos nos extratos avaliados. Para se estudar a variabilidade do conteúdo de DNA nuclear, populações de marolo foram identificadas e georreferenciadas em Minas Gerais, das quais foi coletado material vegetal para estimativa do conteúdo de DNA nuclear utilizando citometria de fluxo. Foi encontrada entre populações de marolo variabilidade para o tamanho do genoma e uma correlação positiva significativa entre conteúdo de DNA e latitude ( $r = 0,46$ ;  $p = 0,0003$ ). Espera-se que os resultados deste trabalho sirvam de subsídio para estudos do potencial alelopático e farmacológico da espécie *A. crassiflora*, além de mitigar a lacuna de conhecimento referente a essa planta e fomentar a conservação desse patrimônio genético.

Palavras-chave: Araticum, Cerrado, citometria de fluxo, alelopatia



## ABSTRACT

The marolo (*Annona crassiflora* Mart.) is an endemic species of the Cerrado undergoing a continuous process of reduction in its populations, in line with the reduction of the dimensions of your biome. This species has many potential uses, so efforts to preserve this genetic resource is necessary. Find a potential use of a species, can stimulate its use, and therefore its conservation. In this study, we aimed to detect allelopathic potential, and evaluate the nuclear DNA content profile of marolo's populations located in Minas Gerais. First, we studied the allelopathy by means of the use of plant extracts, using a extract made by a combination of one fruit part and a solvent. These extracts were evaluated by the analysis of biological responses of three bioindicators (lettuce, broccoli and tomatoes) exposed to the extracts. The fruit parts showed allelopathic potential, especially the ethyl acetate extract of embryo with endosperm, which showed significant inhibitory effect on seeds of lettuce and broccoli, and the methanolic extract of peel which showed inhibitory effect on tomato. The analysis of the extracts by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) showed that the marolo fruit parts are rich in bioactive compounds and it was possible to identify allelochemicals in the evaluated extracts. To study the nuclear DNA content profile, marolo's populations in Minas Gerais were identified and georeferenced, then the plant material was collected for estimation of nuclear DNA content using flow cytometry. Genome size variation was found among individuals of the same populations and between populations, also a positive and significant correlation was established between DNA content and latitude ( $r = 0.46$ ,  $p = 0.0003$ ). It is expected that the results of this paper contribute with the studies involving the pharmacological and allelopathic potential of *A. crassiflora*, mitigate the knowledge gap regarding this plant, stimulating the conservation of this valuable genetic resource.

Keywork: Araticum, Cerrado, flow cytometry, allelopathy

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	10
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>Aspectos gerais da espécie <i>Annona crassiflora</i> Mart.</b> .....	12
<b>2.2</b>	<b>Alelopatia</b> .....	16
<b>2.3</b>	<b>Conteúdo de DNA nuclear vegetal</b> .....	20
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	25
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS</b> .....	31
	<b>ARTIGO 1 Potencial alelopático do fruto de <i>Annona crassiflora</i> Mart.</b> .....	32
	<b>ARTIGO 2 Conteúdo de DNA nuclear em populações in situ de <i>Annona crassiflora</i> Mart.</b> .....	80

**PRIMEIRA PARTE**

## 1 INTRODUÇÃO

Vivemos em um país rico em recursos genéticos, em contrapartida, a utilização desta riqueza é muito limitada e sua conservação ainda não atingiu um patamar satisfatório. A utilização de determinada espécie considerada negligenciada pode ser estimulada por meio de estudos que favoreçam ou elucidem seus potenciais de uso, conseqüentemente ao estimular sua utilização o processo de conservação é também favorecido.

A espécie estudada em questão (*Annona crassiflora*) possui inúmeras propriedades medicinais, nutricionais e farmacológicas, contudo pouco se sabe sobre seu potencial alelopático, o que torna justificável parte deste trabalho.

Mesmo com grandes potenciais de uso, as populações de *A. crassiflora* passam por um processo de redução em número e tamanho. Este fato aliado as dificuldades de propagação características da espécie faz com que pesquisas voltadas a caracterização e conservação da variabilidade genética remanescente se tornem imprescindíveis.

Com a realização deste trabalho buscou-se consolidar o conhecimento sobre o potencial alelopático da espécie e através de citometria de fluxo detectar variabilidade entre populações distintas de *A. crassiflora* para conteúdo de DNA.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais da espécie *Annona crassiflora* Mart.

Dentre os biomas brasileiros, o Cerrado se destaca pela rica biodiversidade, enorme potencial produtivo e fragilidade ambiental na qual se encontra. Estima-se que apenas vinte por cento de sua área original permanece intacta, sendo considerado por especialistas um dos “hotspots” mundiais (MYERS et al., 2000), ou seja, ambiente com número elevado de espécies endêmicas e que sofreu um processo acentuado de degradação. Apesar da vasta variabilidade genética presente nessa região, esse bioma vem sendo suprimido por uma atividade indispensável e de extrema importância que é a produção agrícola, o que nos leva a um dilema que contrapõe a conservação de recursos genéticos ao processo de produção de alimentos. O melhor aproveitamento desse patrimônio natural, o Cerrado, pode ser feito de forma ponderada mantendo a atividade produtiva aliada a preservação dos recursos genéticos presentes nesse bioma.

Dentre as inúmeras espécies podem-se destacar aquelas pertencentes à família Annonaceae, cujo uso alimentício e na medicina local tem importante função social. Dentre os 120 gêneros compreendidos nessa família o gênero *Annona* L. é o maior deles (JOLY, 2002). O gênero *Annona* possui inúmeras espécies frutíferas de importância econômica, presentes tanto no bioma cerrado como na floresta amazônica. Dentre as espécies podemos citar *A. muricata* L. (graviola), *A. cherimola* Miller (cherimoia) e *A. cherimola* x *A. squamosa* (atemoia), entre outras (EGYDIO; DOS SANTOS, 2011). Algumas das espécies encontradas no cerrado são pouco conhecidas e apresentam grande potencial para industrialização e boa aceitação do consumidor, como é o caso da espécie

*Annona crassiflora* Mart., conhecida popularmente por araticum, cabeça-de-negro, panã, marolo, entre outros.

O maroleiro é uma árvore de 4 a 8 metros de altura, encontrado em regiões de cerrado e cerradões, geralmente seu tronco apresenta tortuosidades e é revestido por casca áspera e corticosa resistente ao fogo. Suas folhas são crasso-membranosas, glaucas ao atingir seu desenvolvimento completo e ferrugíneo-hirsutas quando jovens. Apresenta flores solitárias, axilares, com pétalas engrossadas e carnosas. Seu fruto é do tipo baga subglobosa contendo polpa levemente adocicada e de cheiro agradável. O florescimento ocorre no período de outubro a novembro e seus frutos atingem o amadurecimento de janeiro a fevereiro (LORENZI, 2002).

Contudo, a baixa incidência de tais espécies torna seu uso regional e sua produção de caráter extrativista, fato este favorecido pela constante redução do seu habitat natural e pela falta de pesquisas de base agronômica que estimulem a popularização do seu cultivo. O direcionamento de estudos que favoreçam a adequação de culturas do cerrado à produção agrícola, assim como o desenvolvimento de trabalhos que contribuam para a conservação do patrimônio genético são de fundamental importância, tendo em vista seu potencial de uso e posição de risco em que esse habitat se encontra.

O efeito drástico de supressão do habitat natural do marolo nos últimos trinta anos, provocado principalmente pela expansão da fronteira agrícola, constitui um fator decisivo para direcionarmos esforços no que diz respeito ao mapeamento das populações e caracterização da diversidade ainda existente. Estudos voltados à diversidade genética são fundamentais para programas de melhoramento, por meio dos quais muitos dos entraves agronômicos relativos a essa cultura podem vir a ser superados. Há relatos de plantas que apresentam características produtivas e qualidade do fruto diferenciada, o que as torna possíveis genótipos a serem utilizados como plantas matrizes (FILHO et al.,

2009) ou genitores em cruzamentos controlados ou em programas de melhoramento.

Telles et al. (2003) realizaram trabalho de caracterização genética de populações naturais de *A. crassiflora* avaliando o grau de distribuição da variabilidade genética da espécie. Foram avaliadas seis populações, sendo amostrados trinta indivíduos por população e monitoradas por quatro sistemas enzimáticos. O estudo evidenciou elevada variabilidade genética na região para essa espécie, as análises sugerem que a espécie é preferencialmente alógama, o que está de acordo com dados apresentados anteriormente. Existe certa estruturação genética a nível populacional, conseqüentemente grande parte da variabilidade genética está entre populações. Isso nos leva a refletir que potenciais fontes de variabilidade podem ter sido extintas com a contínua supressão do bioma Cerrado.

O estudo do ambiente de ocorrência da espécie nos ajuda a compreender o processo de declínio da espécie e nos dá diretrizes para medidas mitigadoras desse processo. Mesquita et al. (2007) realizaram trabalho de caracterização de ambiente com alta ocorrência natural de *A. crassiflora* considerando variáveis edafoclimáticas. Com a seleção de 14 áreas com alta incidência de *A. crassiflora* e de baixa influência antrópica, foram levantados dados referentes às características físicas, edáficas e de flora. Concluindo que a espécie ocorre com maior densidade em Latossolos não-concrecionários. Apesar de ser espécie adaptada a baixo nível de fertilidade, a área basal total das plantas é influenciada positivamente pelos níveis de Ca, Mg e K no solo e a densidade de plantas é influenciada negativamente pelo nível de Fe no solo.

As propriedades medicinais do marolo são de conhecimento popular e amplamente utilizadas pela medicina local, suas sementes e folhas podem ser utilizadas na elaboração de extratos, para uso terapêutico (ROESLER, 2011). Diversos estudos comprovam o potencial dos fitoquímicos produzidos por essa

espécie. A comprovação de efeito de fitoquímicos antagônicos a organismos prejudiciais ao homem se apresenta como alternativa na elaboração de novos medicamentos eficazes, geralmente com menor efeito colateral. Santos, Boaventura e Oliveira (1994) relataram o isolamento de uma acetogenina, denominada por crassiflorina, cuja atividade citotóxica é potencialmente uma fonte de agentes antineoplásicos naturais. Além disso, o extrato de *A. crassiflora* exibiu citotoxicidade a células cancerígenas do pulmão humano e células tumorais da pele (SANTOS et al., 1996).

O uso das acetogeninas presentes em espécies do gênero *Annona* ainda se mostra incipiente, porém com um caminho promissor pela frente. Um estudo realizado por Mesquita et al. (2005) buscou estudar o efeito de compostos presentes em diversas espécies do Cerrado contra o parasita causador da leishmaniose (*Leishmania donovani*) e contra o agente etiológico da doença de chagas (*Trypanosoma cruzi*). O extrato de *A. crassiflora* foi eficiente no controle *in vitro* desses dois parasitas. Este resultado tem grande valia por se tratar de males que assolam uma grande parcela da população brasileira, e que os medicamentos utilizados para tais patologias apresentam sérios efeitos colaterais além de desenvolverem organismos resistentes.

Outro problema de saúde pública é a dengue, cujo agente transmissor é o inseto *Aedes aegypti*. Seu controle é feito através da eliminação de ambientes propícios ao seu desenvolvimento e eliminação das larvas que irão originar transmissores, o extrato elaborado com a casca da raiz de *A. crassiflora* aparentam conter componentes inseticidas de alta atividade podendo ser utilizado eficientemente no controle de larvas deste inseto (DE OMENA et al., 2007).

Ao se elucidar a presença de compostos citotóxicos trazemos à tona a questão da segurança alimentar, visto que o principal modo de utilização do



marolo é pelo consumo de sua polpa. Por isso, estudos direcionados à sua caracterização comprovam sua qualidade e potencial de uso.

Roesler et al. (2007), através de espectrometria de massa, investigou os componentes de diversas partes do fruto, revelando a presença de importantes componentes bioativos com grande capacidade antioxidante. O marolo é considerado um alimento de alto valor nutricional devido ao seu conteúdo de lipídeos, calorías e fibras, é rico em magnésio e fósforo (DAMIANI et al., 2011).

A desidratação do fruto possibilita seu melhor aproveitamento, originando a farinha da polpa, subproduto rico em fibras que pode ser utilizado em diversas preparações culinárias (CORREA et al., 2011). Foi constatada a ausência de possíveis reações indesejadas que possam inviabilizar a utilização do fruto como alimento. A avaliação de compostos antinutricionais na semente (CARAMORI; LIMA; FERNANDES, 2004) e compostos com atividade mutagênica presente na polpa (DRAGANO et al., 2010) concluíram que o marolo pode ser considerado um alimento seguro para os parâmetros estudados.

## **2.2 Alelopatia**

Alelopatia é um fenômeno de ocorrência natural entre plantas, fungos, algas e bactérias e depende da produção e liberação de metabólitos secundários por determinado organismo, de forma a atuar sobre outro, estimulando ou inibindo seu desenvolvimento através de diferentes mecanismos (FAROOQ et al., 2011), ou seja, é a interação positiva (estimulatória) ou negativa (inibitória) entre organismos por intermédio de compostos orgânicos. Biomoléculas que atuam neste sentido também são conhecidas como aleloquímicos e são alvo de pesquisa principalmente por apresentarem potencial de uso agrícola na fabricação de herbicidas, inseticidas e nematicidas alternativos (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos derivados do metabolismo secundário, produzidos e distribuídos de maneira heterogênea em uma mesma espécie, isso se deve à sua relação direta com o processo de interação e adaptação ao seu respectivo ambiente. Portanto, tais compostos estão ligados ao processo de evolução da espécie, visto que podem conferir vantagens adaptativas que favorecem seu predomínio em determinado habitat (MACIAS et al., 2007).

Esses compostos podem desempenhar diversos papéis nas plantas, como função antibiótica, antifúngica e antiviral, sinalização hormonal, atração de polinizadores, indução da germinação do tubo polínico, prevenção de danos por radiação UV e função antigerminativa e fitotóxica (BOURGAUD; GRAVOT; GONTIER, 2001). Os aleloquímicos que possuem atividade antigerminativa e fitotóxica agem por diferentes mecanismos, como por exemplo, alteração da divisão, alongamento celular, modificação do equilíbrio hormonal, desestabilização da estrutura e permeabilidade das membranas, mudança no padrão de absorção de minerais, alteração da abertura e fechamento estomático, diminuição da fotossíntese, alteração na respiração, inibição de síntese de proteínas, alteração no metabolismo de lipídeos e ácidos orgânicos, inibição ou estimulação de enzimas específicas, modificações na condução de água (RICE, 1984) e alterações no DNA da planta (RIZVI; RIZVI, 1992).

Para que ocorra a supressão de determinada planta pelo fenômeno de alelopatia, é necessário que determinado aleloquímico seja produzido por um organismo e liberado em um ambiente comum. Aleloquímicos podem ser encontrados em diversas partes vegetais como folhas, raízes, tronco e frutos (WEIR; PARK; VIVANCO, 2004), portanto, podem ser liberados através de material vegetal em decomposição, ou também podem ser secretados ativamente através de exsudados radiculares ou liberados como compostos voláteis (BAIS et al., 2003).

A exploração racional de espécies de potencial alelopático pode ser integralizada a sistemas produtivos, no intuito de diversificar métodos de manejo de pragas e espécies invasoras, possibilitando a redução do consumo de pesticidas e, conseqüentemente, proporcionar ganho econômico e ambiental. Com esse intuito, tais espécies podem ser utilizadas como rotação de cultura, cultura protetora, produção de resíduos para incorporação no solo, cobertura verde, produção de extratos vegetais e para isolamento de moléculas, objetivando a síntese de pesticidas (KHANH et al., 2005).

Outra forma de utilização do potencial alelopático em sistemas agrícolas é através do melhoramento genético de plantas. O direcionamento de programas de melhoramento para essa característica, visando à seleção de indivíduos com maior capacidade de supressão de espécies invasoras, pode ser considerado uma forma alternativa de complementar o manejo de plantas daninhas (WORTHINGTON; REBERG-HORTON, 2013). A hibridação de variedades com maior capacidade de supressão de plantas daninhas pode vir a atender a demanda de agricultores orgânicos (WOLFE et al., 2008), pequenos produtores cujo acesso a agroquímicos é limitado (TOURÉ et al., 2011), assim como evitar o desenvolvimento de resistência de espécies invasoras aos herbicidas comerciais.

A característica de supressão de uma planta sobre outra é resultado de dois fatores que muitas vezes são confundidos e considerados como apenas um. São eles competição e alelopatia. O efeito da competição em adição à alelopatia foi denominado interferência (MULLER, 1969). Devido às dificuldades de se isolar o fator competição no processo de interferência entre plantas em bioensaios sob condições de campo faz-se necessária a realização de bioensaios em laboratório para identificação do potencial alelopático da espécie em estudo. Essa técnica se fundamenta na elaboração de extratos contendo material vegetal de espécie doadora (produtora de aleloquímicos) e aplicação em planta receptora

ou também conhecida como bioindicadora (planta sensível ao aleloquímico). A comparação da resposta biológica de uma espécie receptora à aplicação de determinado extrato pode nos levar à confirmação do potencial fitotóxico e inibidor da espécie doadora. O efeito alelopático muitas das vezes não é devido a apenas um único composto, mas proporcionado por diferentes aleloquímicos, por isso o uso de solventes de diversas polaridades na elaboração dos extratos é realizado para uma melhor extração, já que esses compostos se apresentam desde alta até baixa polaridade (SOUZA FILHO;GUILHON; SANTOS, 2010).

Silva et al. (2013) estudaram o potencial alelopático da casca do café através de bioensaios. Como plantas bioindicadoras foram utilizadas alface (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids), repolho (*Brassica chinenses* var. Parachinensis) e picão preto (*Bidens pilosa* L.), as quais foram avaliadas quanto a germinação, crescimento e desenvolvimento. Diversos parâmetros foram avaliados após a aplicação de diferentes concentrações de extratos metanólicos elaborados com casca de café em massa fresca e em massa seca. Concluiu-se que a espécie doadora em questão contém aleloquímicos capazes de inibir o desenvolvimento de outras espécies, assim como interferir em sua germinação.

Ribeiro et al. (2013) utilizaram bioensaios para investigação das propriedades citotóxicas e genotóxicas do marolo (*A. crassiflora* ). Após exposição de sementes de alface aos diferentes extratos etanólicos contendo folha e semente de marolo, foram avaliados seus efeitos na germinação, comprimento radicular, estrutura dos cromossomos e divisão celular das plântulas expostas. Os extratos elaborados com partes do marolo promoveram redução nos parâmetros de crescimento avaliados, assim como demonstraram efeito citogenotóxico.

Plantas daninhas são muito utilizadas como espécies receptoras em bioensaios, pois possibilitam uma estimativa mais precisa do potencial de produção de herbicidas a partir de determinados aleloquímicos. Inoue et al.

(2010) estudaram o efeito de extratos hidroalcoólicos elaborados a partir de sementes, folhas e caules de marolo sobre três espécies de plantas daninhas de importância para a cultura da soja (*Brachiaria brizantha*, *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia*). Os extratos elaborados a partir da semente promoveram maior inibição do crescimento e desenvolvimento das plantas daninhas. A aplicação do extrato na soja (*Glycine Max*) não promoveu inibição da cultura, indicando que o extrato de sementes de *A. crassiflora* apresentou potencial de uso no manejo pós-emergência das espécies daninhas estudadas.

### **2.3 Conteúdo de DNA nuclear vegetal**

A quantidade de DNA nuclear é um parâmetro biológico quantitativo utilizado em diversas áreas como conservação, citogenética, biologia molecular, ecologia, fitogeografia, entre outras.

O conteúdo de DNA é denominado valor C (BENNET; LEITCH, 1995) e expressa o tamanho do genoma. Esse valor é variável entre espécies e também entre indivíduos da mesma espécie (SCHIFINO-WITTMANN, 2001). A variação do conteúdo de DNA nuclear entre Angiospermas pode chegar à ordem de 2400 vezes (BENNET; LEITCH, 2011), porém, mesmo com o crescente número de trabalhos envolvendo a determinação do conteúdo de DNA nuclear de plantas, levando-se em conta um total de 352 mil espécies angiospermas, apenas 2,1% obtiveram seus valores C estimados, (GARCIA et al., 2013). Sua determinação é de grande valia e abre um amplo campo de estudo devido à sua correlação com diversos aspectos relacionados aos organismos vivos. Esse parâmetro está ligado à evolução das espécies, podendo estar correlacionado a diversas características fenotípicas e fenológicas (BENNETT; BHANDOL; LEITCH, 2000). A variação do conteúdo de DNA também está ligada à

distribuição geográfica (BENNETT; SMITH, 1976), a alterações adaptativas e variações ambientais (GRIME, 1996).

Há grande interesse em se correlacionar as variações do conteúdo de DNA às características fenotípicas. Diversos estudos demonstram correlação positiva até certo ponto, entre o tamanho do genoma e caracteres fenológicos, como massa de sementes, tamanho de folha, densidade estomática e taxa de crescimento, altura da planta e tamanho celular (KNIGHT; BEAULIEU, 2008). Além disso, há indícios de que o valor C de DNA também está relacionado com o processo de decréscimo da ocorrência de indivíduos, podendo ser utilizadas para determinação da probabilidade de espécies se tornarem extintas (BENNETT; LEITCH, 2005).

A influência das variações do DNA nuclear vegetal sobre características fenotípicas ainda não estão totalmente esclarecidas. A associação direta entre esses fatores ainda é passível de contestação devido a complexidade de variáveis envolvidas no processo de adaptação das espécies (OLIVER et al., 2007; BEAULIEU et al., 2007), por isso, a associação do tamanho do genoma com fatores morfológicos é o primeiro passo para melhor compreensão do significado funcional do conteúdo de DNA, ou seja, como o tamanho do genoma afeta o fenótipo (KNIGHT; BEAULIEU, 2008).

Tavares et al. (2013) avaliaram o conteúdo de DNA de quatro populações de *Eryngium duriaei* (Apiaceae) localizadas em diferentes altitudes (de 600 a mais de 1700 metros de altitude), revelando similaridade para esse parâmetro entre populações situadas em altitudes semelhantes e entre indivíduos da mesma população. Contudo, entre populações de altitudes discrepantes foi encontrada diferença significativa no conteúdo de DNA, sendo aquela de elevada altitude detentora de genoma significativamente maior.

Li et al. (2013) avaliaram 36 populações de três espécies de *Miscanthus*, desde regiões quentes e úmidas, ao nível do mar, até regiões frias e de elevada

altitude e não encontraram alteração no tamanho do genoma entre populações da mesma espécie localizadas em diferentes ambientes.

A variação do conteúdo de DNA é um tema polêmico muito discutido, principalmente a variação intraespecífica (MURRAY, 2005). Apesar de a heterogeneidade taxonômica estar relacionada à variação do conteúdo de DNA, muitas críticas têm sido feitas a respeito dos trabalhos que expõem variações intraespecíficas. Principalmente devido aos métodos de estimação desses valores.

Falhas técnicas na estimativa podem levar à identificação indevida de variação intraespecífica (BENNET; LEITCH, 2005). No intuito de superar este gargalo, esforços vêm sendo direcionados para a padronização e otimização dos métodos de estimativa deste parâmetro (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

Os principais métodos de mensuração da quantidade de DNA nuclear são microdensitometria de Feulgen e citometria de fluxo (SCHIFINO-WITTMANN, 2001). O método de microdensitometria de Feulgen se baseia na ligação específica do DNA a um corante, sendo possível o estabelecimento de proporcionalidade entre a quantidade de corante incorporada e a quantidade de DNA existente em uma célula. Apesar de fornecer preparações de ótima qualidade é considerado um método trabalhoso e demorado, diferentemente da citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é uma ferramenta analítica de alto rendimento que possibilita simultaneamente a detecção e quantificação de partículas, células e componentes celulares como, por exemplo, o DNA nuclear. O método de citometria de fluxo é provavelmente o método mais utilizado para esta finalidade, devido à precisão, rapidez e facilidade da preparação das amostras. Consiste na preparação de suspensão aquosa contendo núcleos intactos, onde é realizada a coloração do DNA através da utilização de fluorocromos. As partículas coradas são transportadas em fluxo até passarem pelo processo de

focalização hidrodinâmica, ou seja, são reunidas em fluxo estreito passando por um feixe luminoso intenso. A energia luminosa promove a excitação dos fluorocromos aderidos ao DNA nuclear, a luz difusa e a fluorescência emitida são detectadas por sensores ópticos ou detectores de fluorescência (DOLEZEL, 1997). Os sinais detectados pelo sistema óptico são convertidos em sinais elétricos dando origem aos histogramas, por meio dos quais, com o auxílio de um padrão interno (amostra de conteúdo de DNA conhecido) é possível a estimativa do conteúdo de DNA nuclear.

A citometria de fluxo se apresenta como um método robusto e poderoso para diagnóstico taxonômico, com enorme aplicabilidade para o monitoramento e conservação da biodiversidade (KRON; SUDA; HUSBAND, 2007). Zonneveld (2012) utilizou a citometria de fluxo como uma ferramenta de diagnóstico taxonômico. A boa correlação entre tamanho do genoma e distribuição geográfica possibilitou o uso desse valor de forma mais eficiente que um caráter morfológico isolado. Foi possível a indicação da origem geográfica de 19 espécies diferentes de *Araucaria*. Essa técnica se mostrou aplicável a plântulas e sementes, fato que pode contribuir para a identificação e monitoramento de espécies em extinção.

O conhecimento sobre o conteúdo de DNA das espécies vegetais é extremamente limitado, dado o alto percentual inexplorado para essa característica, o que representa um entrave ainda maior quando voltamos a atenção para países como o Brasil que possuem um elevado número de espécies endêmicas e, ao mesmo tempo, vivem um panorama contínuo de desestabilização de seus ecossistemas. Por isso, trabalhos voltados para valorização e conservação dos recursos genéticos podem ser considerados de valor intrínseco ao desenvolvimento econômico sustentável.



Por meio deste trabalho objetivou-se fundamentar o potencial da espécie *A. crassiflora* e analisar a situação atual referente à variabilidade existente em populações *in situ* remanescentes no estado de Minas Gerais.

## REFERÊNCIAS

- BAIS, H. P.; VEPACHEDU, R.; GILROY, S.; CALLAWAY, R.M.; VIVANCO, J.M. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. **Science**, v. 301, n. 5638, p. 1377-1380, 2003.
- BEAULIEU, J. M.; LEITCH, I. J.; KNIGHT, C. A. Genome size evolution in relation to leaf strategy and metabolic rates revisited. **Annals of Botany**, v. 99, n. 3, p. 495-505, 2007.
- BENNETT, M. D.; BHANDOL, P.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses—807 new estimates. **Annals of Botany**, v. 86, n. 4, p. 859-909, 2000.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, v. 76, n. 2, p. 113-176, 1995.
- BENNETT, M.; LEITCH, I. Plant genome size research: a field in focus. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 1-6, 2005.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Genome size and its uses: the impact of flow cytometry. **Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes**, p. 153-176, 2007.
- BENNETT, M.; LEITCH, I. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. **Annals of Botany**, v. 107, n. 3, p. 467-590, 2011.
- BENNETT, M. D.; SMITH, J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 274, n. 933, p. 227-274, 1976.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; GONTIER, M.E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.
- CARAMORI, S. S.; LIMA, C. S.; FERNANDES, K. F. Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian Savannas. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 253-259, 2004.

CORRÊA, S. C.; CLERICI, M. T. P. S.; GARCIA, J. S.; FERREIRA, E. B.; EBERLIN, M. N.; AZEVEDO, L. Evaluation of dehydrated marolo (*Annona crassiflora*) flour and carpels by freeze-drying and convective hot-air drying. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2385-2390, 2011.

DAMIANI, C.; VILAS BOAS, E. V. B.; ASQUIERI, E. R.; LAGE, M. E.; OLIVEIRA, R. A.; SILVA, F. A.; PINTO, D. M.; RODRIGUES, L. J.; SILVA, E. P.; PAULA, N. R. F. Characterization of fruits from the savanna: Araça (*Psidium guinnensis* Sw.) and Marolo (*Annona crassiflora* Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 723-729, 2011.

DE OMENA, M. C.; NAVARRO, D.M.A.F; DE PAULA, J. E; LUNA, J. S, DE LIMA, M. R. F.; SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2549-2556, Sep 2007.

DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **formerly Genetica Polonica**, v. 38, 1997. P. 285-302

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 99-110, 2005.

DRAGANO, N.; DE VENANCIO, V. P.; DE ARAÚJO PAULA, F. B.; DELLA LUCIA, F.; DE OLIVEIRA FONSECA, M. J.; AZEVEDO, L. Influence of Marolo (*Annona crassiflora* Mart.) Pulp Intake on the Modulation of Mutagenic/Antimutagenic Processes and Its Action on Oxidative Stress In Vivo. **Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)**, v. 65, n. 4, p. 319-325, 2010.

EGYDIO, A. P. M.; DOS SANTOS, D. Underutilized Annona Species from the Brazilian Cerrado and Amazon Rainforest: A Study on Fatty Acids Profile and Yield of Seed Oils. **Economic Botany**, v. 65, n. 3, p. 329-333, Sep 2011.

FAROOQ, M.; JABRAN, K.; CHEEMA, Z.A.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K.H.M. The role of allelopathy in agricultural pest management. **Pest Management Science**, v. 67, n. 5, p. 493-506, May 2011.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 1, p. 175-204, 2000.

FILHO, J. R. B.; NAVES, R. V.; CHAVES, L. J.; NASCIMENTO, J. L.; AGUIAR, A. V. Produção de frutos e caracterização de ambientes de ocorrência de plantas nativas de araticum no cerrado de Goiás. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol.31, n.2, pp. 461-473, Jun. 2009.

GARCIA, S.; LEITCH, I. J.; ANADON-ROSELL, A.; CANELA, M. Á.; GÁLVEZ, F.; GARNATJE, T.; GRAS, A.; HIDALGO, O.; JOHNSTON, E.; DE XAXARS, G. M.; PELLICER, J.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; VALLES, J.; VITALES, D.; BENNETT, M. D. Recent updates and developments to plant genome size databases. **Nucleic acids research**, p. gkt1195, 2013.

GRIME, J. Testing predictions of the impacts of global change on terrestrial ecosystems. **Aspects of Applied Biology**, 1996.

INOUE, M. H.; SANTANA, D. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; POSSAMAI, A. C. S.; SILVA, L. E.; PEREIRA, M. J. B.; PEREIRA, K. M. Potencial alelopático de *Annona crassiflora*: Efeitos sobre plantas daninhas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 3, p. 489-498, 2010.

JOLY, A. B. Introdução à taxonomia vegetal. Companhia Editora Nacional, São Paulo 2002. 634 p

KHANH, T.; CHUNG, M.I.; XUAN, T.D.; TAWATA, S. The exploitation of crop allelopathy in sustainable agricultural production. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 191, n. 3, p. 172-184, 2005.

KNIGHT, C. A.; BEAULIEU, J. M. Genome size scaling through phenotype space. **Annals of Botany**, v. 101, n. 6, p. 759-766, 2008.

KRON, P.; SUDA, J.; HUSBAND, B. C. Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 38, p. 847-876, 2007.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol. 1. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, p. 368, 2002.

LI, X.; HU, D.; LUO, M.; ZHU, M.; LI, X.; LUO, F.; LI, J.; YAN, J. Nuclear DNA content variation of three *Miscanthus* species in China. **Genes & Genomics**, v. 35, n. 1, p. 13-20, 2013.

MACIAS, F. A.; MOLINILLO, J.M.G.; VARELA, R.M.; GALINDO, J.C.G. Allelopathy - a natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, v. 63, n. 4, p. 327-348, 2007.

MESQUITA, M. A. M.; NAVES, R. V.; SOUZA, E. R. B.; BERNARDES, T. G.; SILVA, L. B. Caracterização de ambientes com alta ocorrência natural de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) no estado de Goiás. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.1, p.15-19, 2007.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; DE PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783-787, Nov 2005.

MULLER, C. H. Allelopathy as a factor in ecological process. **Plant Ecology**, v. 18, n. 1, p. 348-357, 1969.

MURRAY, B. When does intraspecific C-value variation become taxonomically significant? **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 119-125, 2005.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A DA; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-8, 24 mar 2000.

OLIVER, M. J.; PETROV, D.; ACKERLY, D.; FALKOWSKY, P.; SCHOFIELD, O.M. The mode and tempo of genome size evolution in eukaryotes. **Genome Research**, v. 17, n. 5, p. 594-601, 2007.

RIBEIRO, L. R.; SANTOS, M.F.; SILVA, Q.M.; PALMIERI, M.J.; ANDRADE-VIEIRA, L.F.; DAVIDE, L.C. Cytogenotoxic effects of ethanolic extracts of *Annona crassiflora* (Annonaceae). **Biologia**, v. 68, n. 3, p. 433-438, 2013.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2nd ed., New York, Academic Press, 1984. 368 p.

RIZVI, S.; RIZVI, V. Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. In: (Ed.). **Allelopathy**: Springer, p.443-472, 1992.

ROESLER, R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 93-100, 2011.

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1048-1054, 2007.

SANTOS, L.P.; BOAVENTURA M.A.D.; OLIVEIRA A.B. Crassiflorina, uma nova acetogenina tetra-hidrofurânica citotóxica de *Annona crassiflora* (Araticum). **Química Nova**, v. 5, n.17, p. 387-391, 1994.

SANTOS, L.P.; BOAVENTURA, M.A.D.; SUN, N.J. CASSADY, J.M.; OLIVEIRA, A.B. Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 705-707, Jun 1996.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Nuclear DNA content determination in plants. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 897-902, 2001.

SILVA, R. M.; BRIGATTI, J.G.F.; SANTOS, V.H.M.; MECINA, G.F. Allelopathic effect of the peel of coffee fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 158, p. 39-44, 2013.

SOUZA FILHO, A. D. S.; GUILHON, G.; SANTOS, L. D. S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório–revisão crítica. **Planta Daninha, Viçosa**, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.

TAVARES, A.; LOUREIRO, J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L.; CANHOTO, J. M.; PAIVA, J. Characterization and distinction of two subspecies of *Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss., an Iberian endemic Apiaceae, using flow cytometry and essential oils composition. **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, n. 3, p. 611-618, 2013.

TELLES, M.P.C.; VALVA, F.D.; BANDEIRA, L.F.; COELHO, A.S.G. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.-Annonaceae) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.25, n.1, p.123-129, 2003.

TOURÉ, A.; RODENBURG, J.; SAITO, K.; OIKEH, S.; FUTAKUCHI, K.; GUMEDZOE, D.; HUAT, J. Cultivar and weeding effects on weeds and rice yields in a degraded upland environment of the coastal savanna. **Weed Technology**, v. 25, n. 3, p. 322-329, 2011.

WEIR, T. L.; PARK, S.-W.; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current opinion in plant biology**, v. 7, n. 4, p. 472-479, 2004.

WOLFE, M.; BARESEL, J.P.; DESCLAUX, D.; GOLDRINGER, I.; HOAD, S.; KOVACS, G.; LOSCHENBERGER, F.; MIEDANER, T.; OSTERGARD, H.; LAMMERTS VAN BUEREN, E.T. Developments in breeding cereals for organic agriculture. **Euphytica**, v. 163, n. 3, p. 323-346, 2008.

WORTHINGTON, M.; REBERG-HORTON, C. Breeding cereal crops for enhanced weed suppression: Optimizing allelopathy and competitive ability. **Journal of chemical ecology**, p. 1-19, 2013.

ZONNEVELD, B. Genome sizes of all 19 *Araucaria* species are correlated with their geographical distribution. **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, n. 7, p. 1249-1255, 2012.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**



**ARTIGO 1** Potencial alelopático do fruto de *Annona crassiflora* Mart.

## RESUMO

Muitas espécies do Cerrado apresentam potencial alimentício e farmacológico, entretanto, existem poucos estudos voltados a essas espécies endêmicas, como é o caso da espécie *Annona crassiflora* Mart. que, dentre outras potencialidades possui capacidade de produção de compostos bioativos de ação alelopática. Por meio de bioensaios avaliou-se o potencial de supressão de diferentes partes do fruto de *A. crassiflora* sobre o crescimento e desenvolvimento de sementes comerciais de alface, brócolis e tomate. Todas as partes do fruto apresentaram algum grau de inibição, dependendo da espécie bioindicadora e do solvente utilizado, porém o extrato do embrião com endosperma em meio de acetato de etila apresentou maior fitotoxidez sobre a alface e brócolis, enquanto o tomate foi mais afetado pelo extrato metanólico da casca. Pela técnica de espectrometria de massas por ionização por “electrospray” (ESI-MS) foi possível identificar nos extratos do embrião com endosperma e da casca, a presença de diversos compostos de ação alelopática já comprovada.

Palavras-chave: Alelopatia. araticum. marolo. Cerrado. metabólitos secundários.

### ABSTRACT

Many Cerrado species have food and pharmacological potential, however, there are few studies regarding these endemic species, such as *Annona crassiflora* Mart. that among other possibilities is capable of producing allelopathic bioactive compounds. Testing plant extracts by means of bioassays, we evaluated the phytotoxic capacity of different parts of the fruit of *A. crassiflora* on the growth and development of commercial seed of lettuce, broccoli and tomatoes. All fruit parts showed some degree of inhibition, depending on the species used as a bioindicator and the solvent utilized in the extract, the ethyl acetate extract of the embryo with endosperm promoted a higher toxicity symptoms on lettuce and broccoli, while the tomato was higher affected by the peel methanolic extract. Through electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was possible to identify the presence of several allelopathic compounds previously documented in the extract of embryo with endosperm and peel extract.

Keyword: Allelopathy, araticum, marolo, Cerrado, secondary metabolites

## 1 INTRODUÇÃO

A região do cerrado destaca-se pela diversidade de recursos genéticos e elevado potencial produtivo. Com a contínua expansão da fronteira agrícola houve acréscimo significativo no que se refere ao volume de produção, mas, em contrapartida, favoreceu um processo de declínio deste ecossistema (BRANNSTROM et al., 2008).

Espécies endêmicas do Cerrado vêm passando por um processo progressivo de redução em suas populações, o que aumenta as chances de serem incluídas na lista de plantas em extinção. Dentre as espécies em questão está a *A. crassiflora*, também conhecida como marolo, panã, araticum e cabeça de nego.

O maroleiro produz fruto muito apreciado, principalmente pela população de Minas Gerais. Por ter uso medicinal e alimentício desempenha um valioso papel social em comunidades localizadas em região de Cerrado. Na medicina popular local, suas folhas e sementes são recomendadas para diarreia, reumatismo, sífilis e outras enfermidades, enquanto a polpa é um alimento de alto valor nutricional, com propriedades antioxidantes (DAMIANI et al., 2011; ROESLER et al., 2007), sendo consumida *in natura*, na forma de doces, polpas e diversos outros derivados industrializados.

Além do uso alimentício e medicinal, estudos comprovam sua atividade citogenotóxica (RIBEIRO et al., 2013; ROESLER, 2011; VILAR; FERRI; CHEN-CHEN, 2011), inseticida (DE OMENA et al., 2007) e alelopática (INOUE et al., 2010). Neste trabalho foi enfatizado seu potencial alelopático.

A alelopatia pode ser definida como a interação entre plantas, por intermédio de metabólitos que atuam estimulando ou inibindo, por meio de diferentes mecanismos o desenvolvimento de organismos em suas adjacências (FAROOQ et al., 2011). A capacidade de produção de compostos de potencial inibidor, também denominados aleloquímicos, está relacionada com a evolução

de cada indivíduo e as vantagens adaptativas que esta característica confere, favorecendo a perpetuação da espécie (MACIAS et al., 2007). A identificação do potencial alelopático de determinada planta pode possibilitar sua integração em sistemas produtivos, de forma a complementar as técnicas de manejo de pragas e plantas daninhas.

Estudos evidenciam que a utilização de extratos vegetais combinados a um herbicida é uma técnica eficiente para manejo de plantas invasoras em algumas culturas (FAROOQ et al., 2011). Essa técnica permite a redução do volume de agroquímico utilizado, que além de trazer benefícios econômicos pode mitigar o processo de desenvolvimento de resistência em plantas daninhas.

Plantas com potencial alelopático podem ter diversas aplicações, mas um dos pontos fundamentais é a elucidação de novos mecanismos de ação herbicida. Muitos aleloquímicos operam por mecanismos diferentes dos herbicidas sintéticos, por isso podem levar a compreensão de novos modos de ação, ainda não utilizados na agricultura (VYVYAN, 2002). A maioria dos herbicidas sintéticos desenvolvidos possui poucos modos de ação e agindo sobre um número reduzido de sítios, o que, do ponto de vista ecológico é indesejado (MACIAS et al., 2007). A identificação de possíveis fontes de aleloquímicos é a primeira etapa para elucidação de novos mecanismos de ação herbicida.

Com este trabalho objetivou-se avaliar o efeito de extratos elaborados com diferentes partes do fruto da espécie *A. crassiflora*, identificando seu possível potencial alelopático, assim como identificar compostos com atividade fitotóxica presentes nos extratos por meio de espectrometria de massas por “electrospray” (ESI-MS).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram realizados três bioensaios para verificação da resposta biológica de espécies bioindicadoras submetidas a extratos vegetais elaborados com partes do fruto de *A. crassiflora*.

Os tratamentos consistiram de 15 extratos preparados com uma combinação de um solvente com uma parte do fruto ou ausência (solvente puro) e a água como um tratamento adicional (testemunha). As partes do fruto utilizadas foram casca, polpa, tegumento, embrião com endosperma e ausência de parte do fruto (solvente puro). Utilizamos apenas um solvente por extrato. Foram utilizados solventes com diferentes polaridades, em ordem crescente de polaridade: hexano, acetato de etila e metanol. O preparo dos extratos foi realizado a partir da metodologia proposta por Escudero *et al.* (2000), com algumas modificações.

Frutos maduros foram obtidos no município de Itacarambi no estado de Minas Gerais, os quais foram lavados e despulpados. Posteriormente, todos os resíduos de polpa presentes nas sementes foram removidos com auxílio de uma faca, as sementes foram lavadas em água destilada e deixadas em temperatura ambiente para evaporação da água (24 horas) em ambiente de laboratório. Após secagem, o tegumento foi removido com auxílio de um alicate previamente esterilizado. Foram separadas as seguintes partes do fruto: embrião com endosperma, tegumento, polpa e casca.

As partes foram pesadas e maceradas separadamente, em cadinho de porcelana. Os extratos foram elaborados na proporção de 1:5 g/v (grama da parte do fruto por volume do solvente). Após adição dos solventes às respectivas partes do fruto, os extratos foram acondicionados em frascos escuros e mantidos sob refrigeração por 24 horas, posteriormente, a solução foi filtrada com papel

filtro Whatman n° 1 e recondicionada em frascos escuros sob refrigeração. Todo o preparo foi realizado evitando-se a incidência direta de luz.

Nos diferentes bioensaios foram utilizadas sementes comerciais de alface (*Lactuca sativa* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum*.) e brócolis (*Brassica oleracea* L.), conforme metodologia prescrita pelas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Primeiramente, os gerboxes foram desinfestados com hipoclorito de sódio a 2% e o papel germinativo ou mata borrão, autoclavado por 20 minutos. Após a distribuição de dois papéis por caixa, foi adicionado 3,0 mL de cada extrato por gerbox, referente aos 16 tratamentos. Os gerboxes foram mantidos abertos por 24 horas, para a total evaporação dos solventes e posteriormente foram adicionados 3,0 mL de água destilada em cada gerbox. Após a secagem do papel foram distribuídas as sementes da espécie bioindicadora (50 sementes por gerbox) e aplicou-se água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. As caixas foram levadas para germinador em estufa BOD onde foram mantidas a uma temperatura constante de 20° C, conforme as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009), na ausência de luz.

Durante sete dias foram realizadas análises diárias da germinação (intervalo de 24 horas), para determinação do índice de velocidade de germinação (MAGUIRE, 1962) e porcentagem total de germinação, sendo consideradas germinadas aquelas que apresentaram protrusão (emissão) de estruturas essenciais das plântulas (radícula e/ou hipocótilo).

Ao final de cada bioensaio foram mensurados valores de massa e comprimento das espécies bioindicadoras. Para obtenção da massa seca, as estruturas foram pesadas e postas para secar em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 65°C até atingirem peso constante, enquanto o comprimento foi obtido com o auxílio de uma régua milimetrada.

Cada experimento foi montado em esquema fatorial com um tratamento adicional no esquema  $5 \times 3 + 1$ , onde foram utilizados cinco níveis do fator parte do fruto (casca, polpa, tegumento, embrião com endosperma e ausência de parte do fruto) e três níveis do fator solvente (hexano, acetato de etila e metanol) e o tratamento adicional composto pela água. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições e 50 sementes por parcela. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GENES (CRUZ, 2013). A análise de variância foi realizada utilizando-se o modelo fatorial simples com um tratamento adicional. Para comparação de médias foi utilizado o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na identificação dos compostos presentes nos extratos do fruto de *A. crassiflora*, os espectros de massas por “electrospray” (ESI-MS) foram obtidos em espectrômetro *LCQFleet* da Thermo-Scientific, utilizando velocidade de fluxo de  $15 \mu\text{Lmin}^{-1}$ , com bomba de seringa, voltagem spray de 4,0-6,5 V, voltagem capilar de 11,0 V, temperatura capilar de  $275^\circ \text{C}$  e nitrogênio empregado como gás nebulizador. Os extratos foram analisados diretamente por ESI-MS no modo negativo. Os dados obtidos nos espectros foram comparados com dados encontrados na literatura.



### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Bioensaio realizado com alface**

No bioensaio realizado com alface, o extrato do embrião com endosperma à base de acetato de etila foi o tratamento que promoveu maior inibição para todos os caracteres estudados e influenciou drasticamente a porcentagem e índice de velocidade de germinação (Figura 1). Sementes submetidas ao extrato do embrião com endosperma em meio de acetato de etila apresentaram 1% de germinação e índice de velocidade de germinação de 0,07 (Tabela 1).

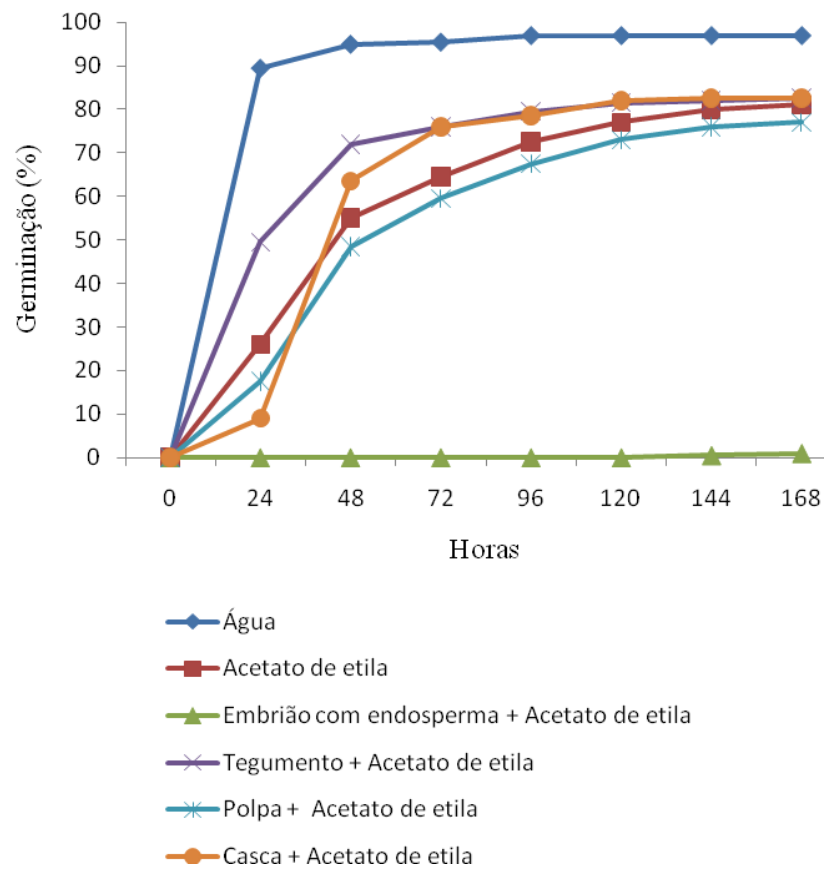


Figura 1 Porcentagem de germinação acumulada de sementes de alface (*Lactuca sativa*), com aplicação de extratos em meio de acetato de etila, água e acetato de etila puro, medidos ao longo de sete dias, em intervalos de 24 horas

Tabela 1 Germinação (% G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento do hipocótilo (CH), comprimento da radícula (CR), massa fresca do hipocótilo (MFH), massa fresca da radícula (MFR), massa seca do hipocótilo (MSH) e massa seca da radícula (MSR) de alface (*Lactuca sativa*) em função de diferentes extratos de *Annona crassiflora* Mart. e água

<b>Tratamentos</b>	<b>% G</b>	<b>IVG</b>	<b>CH</b>	<b>CR</b>	<b>MFH</b>	<b>MFR</b>	<b>MSH</b>	<b>MSR</b>
Água	97 a	46,39 a	4,89 a	2,28 b	17,43 a	2,15 a	0,71 a	0,12 c
Metanol	97,5 a	48,39 a	5,03 a	2,85 b	17,89 a	2,36 a	0,72 a	0,15 b
Acetato de Etila	80,5 b	22,97 c	4,21 b	1,87 c	14,89 a	1,92 a	0,78 a	0,12 c
Hexano	95 a	45,73 a	4,65 a	2,50 b	16,54 a	2,52 a	0,70 a	0,13 b
Embrião e Endosperma + Metanol	96,5 a	44,29 a	4,17 b	0,81 e	17,33 a	1,75 a	0,76 a	0,10 c
Tegumento + Metanol	98,5 a	47,83 a	3,81 b	1,27 d	15,58 a	2,42 a	0,72 a	0,21 a
Polpa + Metanol	95 a	45,14 a	4,70 a	1,35 d	17,90 a	1,22 b	0,76 a	0,10 c
Casca + Metanol	92 a	37,10 b	4,05 b	1,14 d	16,99 a	2,24 a	0,78 a	0,11 c
Embrião e Endosperma + Acetato de Etila	1 c	0,07 d	0,17 c	0 f	0,75 b	0 c	0,37 a	0 d
Tegumento + Acetato de Etila	82,5 b	34,50 b	3,80 b	1,40 d	14,22 a	2,05 a	0,76 a	0,14 b
Polpa + Acetato de Etila	77 b	21,45 c	4,06 b	1,39 d	15,13 a	1,78 a	0,81 a	0,11 c
Casca + Acetato de Etila	82,5 b	20,53 c	3,97 b	1,63 c	15,23 a	2,12 a	0,78 a	0,11 c
Embrião e Endosperma + Hexano	95,5 a	46,41 a	4,40 a	2,50 b	16,05 a	2,14 a	0,71 a	0,15 b
Tegumento + Hexano	97,5 a	45,85 a	4,58 a	2,63 b	19,24 a	2,22 a	0,73 a	0,15 b
Polpa + Hexano	93,5 a	45,01 a	4,86 a	3,37 a	17,39 a	2,24 a	0,72 a	0,14 b
Casca + Hexano	98 a	46,29 a	4,40 a	2,53 b	15,99 a	2,25 a	0,69 a	0,14 b
CV (%)	8,18	12,85	10,27	14,29	12,84	22,39	26,51	13,07

Médias seguidas de mesma letra na coluna pertencem a um mesmo grupo e não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Sob o extrato do embrião com endosperma em meio de acetato de etila, as plântulas apresentaram comprimento médio do hipocótilo de 0,17 cm (Tabela 1), o que corresponde a 96,42% de inibição quando comparado com a testemunha (Figura 2).

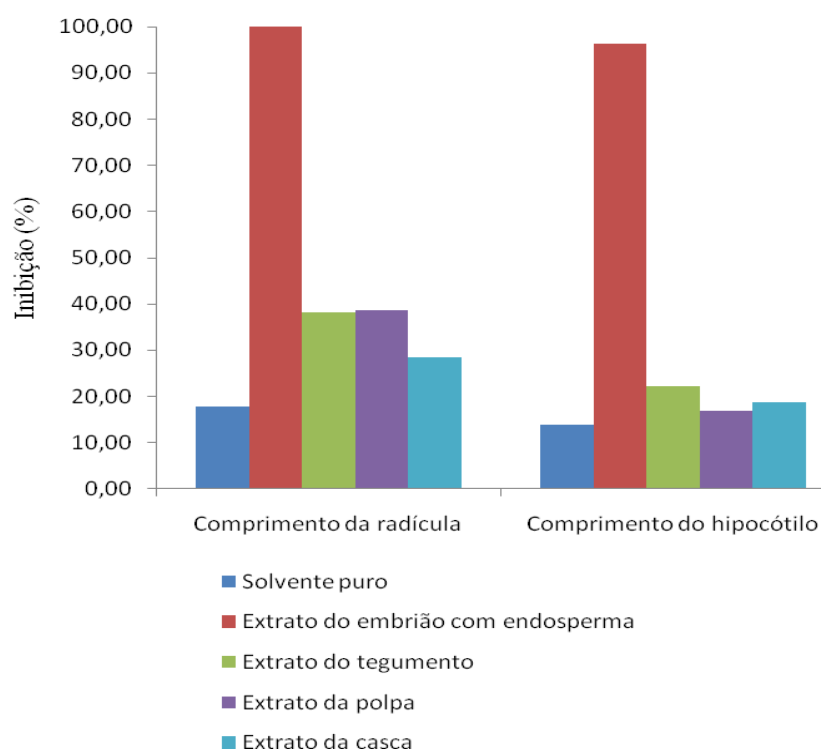


Figura 2 Porcentagem de inibição do comprimento da radícula e hipocótilo de plântulas de alface (*Lactuca sativa*) submetidas aos extratos em meio de acetato de etila e acetato de etila puro.

A protrusão das sementes de alface ocorreu sem o desenvolvimento da radícula, sendo o hipocótilo a única estrutura formada. Portanto, a radícula foi totalmente inibida (Figura 2).

O extrato do embrião com endosperma em meio de acetato de etila foi o único tratamento que afetou negativamente a massa fresca do hipocótilo de

alface, apresentando valor médio de 0,75mg (Tabela 1), o que corresponde à inibição de 89,96% . O extrato do embrião com endosperma em meio de acetato de etila também apresentou maior efeito sobre a massa fresca da radícula (Tabela 1). Neste caso ocorreu o desenvolvimento de plantas anormais (sem radícula) e afetou diretamente a magnitude dos outros parâmetros relacionados à raiz.

Os valores de massa seca de hipocótilo não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 1), enquanto a massa seca média da radícula foi afetada negativamente por apresentar valor de massa igual a zero (Tabela 1).

### **3.2 Bioensaio realizado com brócolis**

No bioensaio realizado com brócolis o extrato do embrião com endosperma em meio de acetato de etila promoveu efeito mais acentuado sobre germinação (Figura 3).

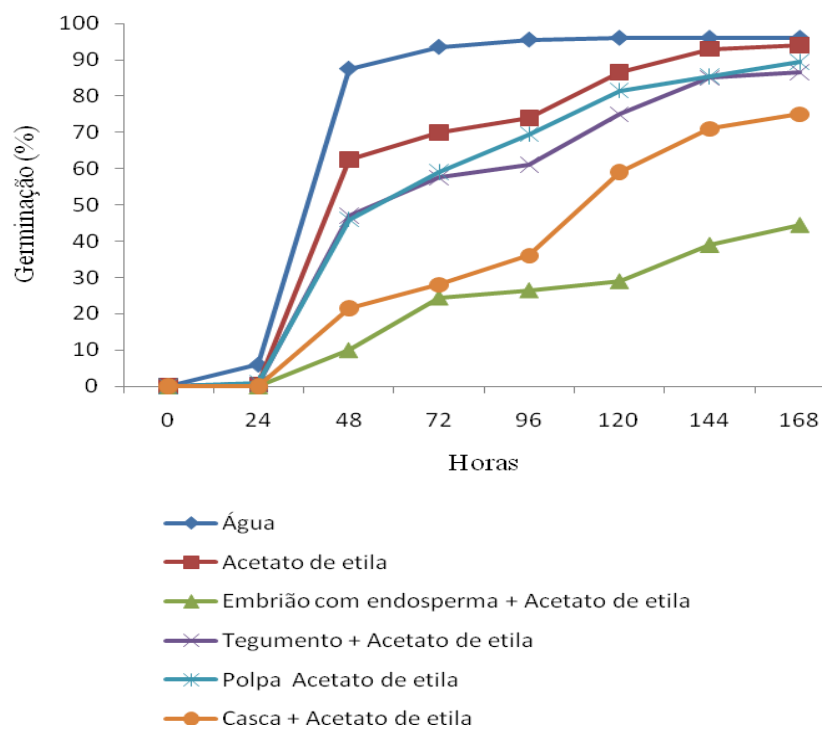


Figura 3 Porcentagem de germinação acumulada de sementes de brócolis (*Brassica oleracea*), com aplicação de água, extratos em meio de acetato de etila, e acetato de etila puro, medidos ao longo de sete dias, em intervalos de 24 horas.

Sementes submetidas a esse tratamento apresentaram 44,5% de germinação (Tabela 2) e IVG de 6,64. O extrato da casca elaborado com acetato de etila não diferiu estatisticamente do extrato da semente para o parâmetro IVG, apresentando valor de 11,04.

Tabela 2 Porcentagem de germinação (% G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento do hipocótilo (CH), comprimento da radícula (CR), massa fresca do hipocótilo (MFH), massa fresca da radícula (MFR), massa seca do hipocótilo (MSH) e massa seca da radícula (MSR) de brócolis (*Brassica oleracea*) em função de diferentes extratos de *Annona crassiflora* Mart. e água

Tratamentos	% G	IVG	CH	CR	MFH	MFR	MSH	MSR
Água	96 a	24,79 a	2,85 a	1,75 d	18,5 b	0,51 b	1,84 a	0,17 c
Metanol	96 a	23 a	3,00 a	2,73 b	17,86 b	0,45 b	1,71 a	0,19 b
Acetato de Etila	94 a	19,48 a	2,32 b	2,26 c	16,93 c	0,61 b	1,86 a	0,16 c
Hexano	94,5 a	23,26 a	3,59 a	4,24 a	23,53 a	0,84 a	1,78 a	0,27 a
Embrião e Endosperma + Metanol	94,5 a	22,98 a	2,31 b	0,81 e	16,24 c	0,47 b	1,82 a	0,13 c
Tegumento + Metanol	94 a	23,08 a	2,52 b	0,72 e	16,32 c	0,45 b	1,85 a	0,13 c
Polpa + Metanol	92,5 a	21,77 a	1,86 c	0,51 e	13,30 c	0,37 b	1,95 a	0,10 d
Casca + Metanol	88 a	19,66 a	2,08 c	0,66 e	13,96 c	0,34 b	1,85 a	0,12 c
Embrião e Endosperma + Acetato de Etila	44,5 b	6,64	0,56 d	0,28 e	7,74 d	0,31 b	1,68 a	0,04 d
		c						
Tegumento + Acetato de Etila	86,5 a	16,40 b	2,05 c	1,19 e	14,90 c	0,93 a	1,97 a	0,14 c
Polpa + Acetato de Etila	89,5 a	16,79 b	2,4 b	1,73 d	18,35 b	0,87 a	2,00 a	0,15 c
Casca + Acetato de Etila	75 a	11,04 c	1,58 c	0,99 e	13,12 c	0,58 b	1,98 a	0,08 d
Embrião e Endosperma + Hexano	98,5 a	24,41 a	2,52 b	0,9 e	15,71 c	0,46 b	1,61 a	0,13 c
Tegumento + Hexano	96 a	23,48 a	3,02 a	1,72 d	19,33 b	0,46 b	1,97 a	0,15 c
Polpa + Hexano	95 a	23,57 a	3,21 a	3,21 b	22,84 a	1,09 a	2,00 a	0,25 a
Casca + Hexano	93,5 a	23,95 a	3,05 a	2,24 c	20,24 b	0,70 a	1,98 a	0,19 b
CV (%)	13,84	21,21	20,13	30,34	18,60	46,46	16,10	26,79

Médias seguidas de mesma letra na coluna pertencem a um mesmo grupo e não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O extrato do embrião com endosperma em meio de acetato de etila também promoveu efeito inibitório sobre o crescimento do hipocótilo, apresentando valor de 0,56cm, o que corresponde à inibição de 80,09% (Figura 4).

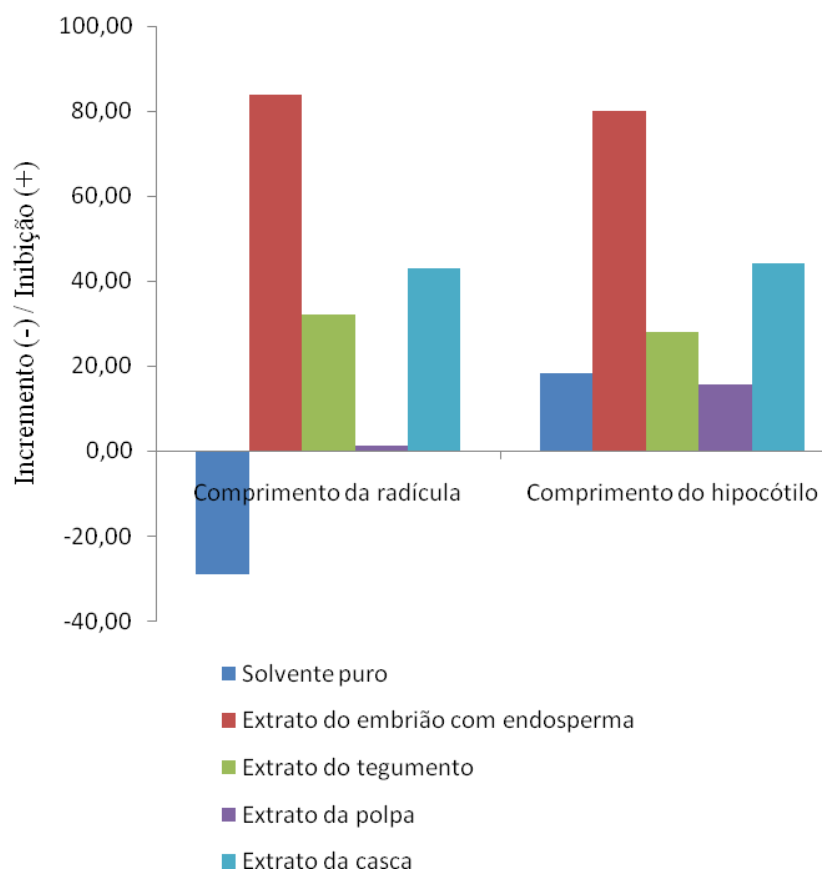


Figura 4 Porcentagem de inibição (positivo) e incremento (negativo) do comprimento da radícula e do hipocótilo em plântulas de brócolis (*Brassica oleraceae*) submetidas aos solventes em meio de acetato de etila e acetato de etila puro.



Para o parâmetro comprimento da radícula, diversas combinações de solvente com parte do fruto (extrato) apresentaram capacidade de inibição. Os extratos do embrião com endosperma, casca e tegumento em meio de acetato de etila, assim como o hexânico do embrião com endosperma e todos os metanólicos, promoveram inibição da radícula e não diferiram estatisticamente entre si. Entretanto, plântulas expostas ao extrato do embrião com endosperma em meio de acetato de etila apresentaram o menor valor numérico para comprimento radicular, com valor de 0,28 cm (Tabela 2), o que representa a inibição de 83,86 % (Figura 4), esse tratamento também apresentou o menor valor numérico para massa fresca média do hipocótilo, com valor de 7,74 mg (Tabela 2), o que representa a inibição em torno de 58% (Figura 5).

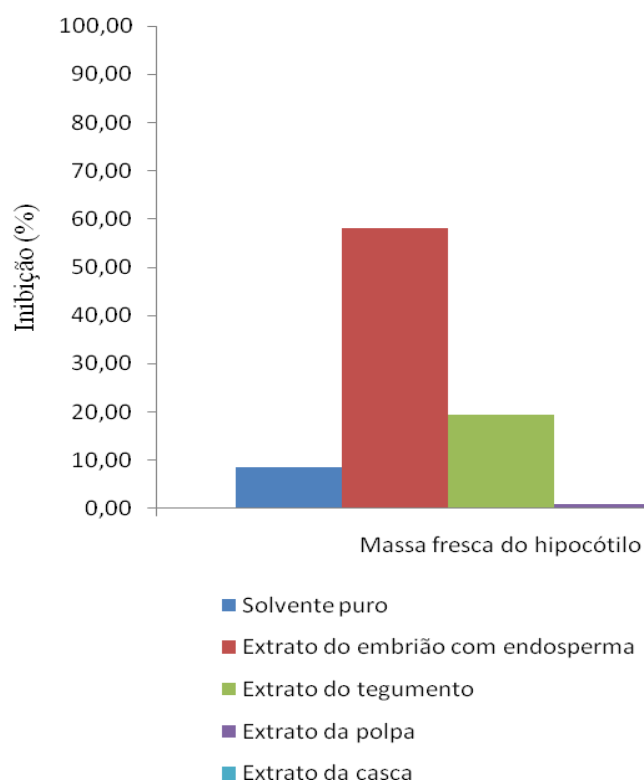


Figura 5 Porcentagem de inibição da massa fresca do hipocótilo de plântulas de brócolis (*Brassica oleraceae*) submetidas a extratos elaborados com acetato de etila e acetato de etila puro

Os valores de massa fresca média da raiz foram afetados negativamente pelos extratos hexânicos da semente e tegumento, onde plântulas apresentaram 0,46 mg para ambos os tratamentos (Tabela 2). Apesar de ser possível encontrar valores numéricos menores, como é o caso de alguns extratos metanólicos e em meio de acetato de etila, esses extratos não diferiram estatisticamente de seus solventes puros, portanto, as partes do fruto não são responsáveis pela inibição nesse caso. Os valores de massa seca média do hipocótilo não apresentaram diferença significativa (Tabela 2).

Alguns tratamentos promoveram incremento na massa fresca média da radícula, principalmente os extratos do tegumento e da polpa em meio de acetato de etila, os quais apresentaram valores de 0,93mg e 0,87mg, respectivamente, (Tabela 2), o que corresponde ao acréscimo de 81,16% e 68,6% ( Figura 6).

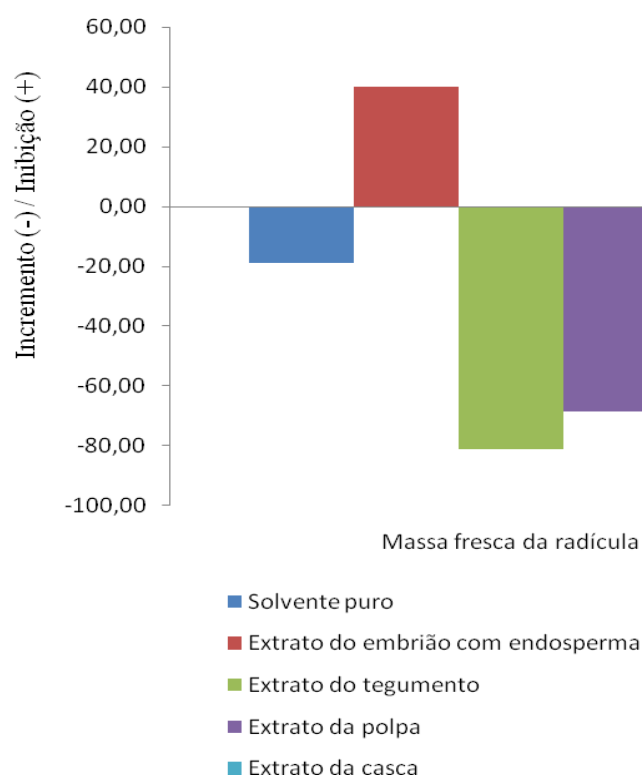


Figura 6 Porcentagem de inibição (positivo) e incremento (negativo) da massa fresca da radícula de plântulas de brócolis (*Brassica oleraceae*) submetidas a extratos em meio de acetato de etila e acetato de etila puro.

Os extratos do embrião com endosperma e casca em meio de acetato de etila foram os tratamentos que proporcionaram menores valores numéricos de massa seca média da radícula, apresentando valores de 0,04 mg, 0,08 mg,

respectivamente, (Tabela 2), o que corresponde à inibição de 76,81% e 52,17%, nessa ordem, (Figura 7).

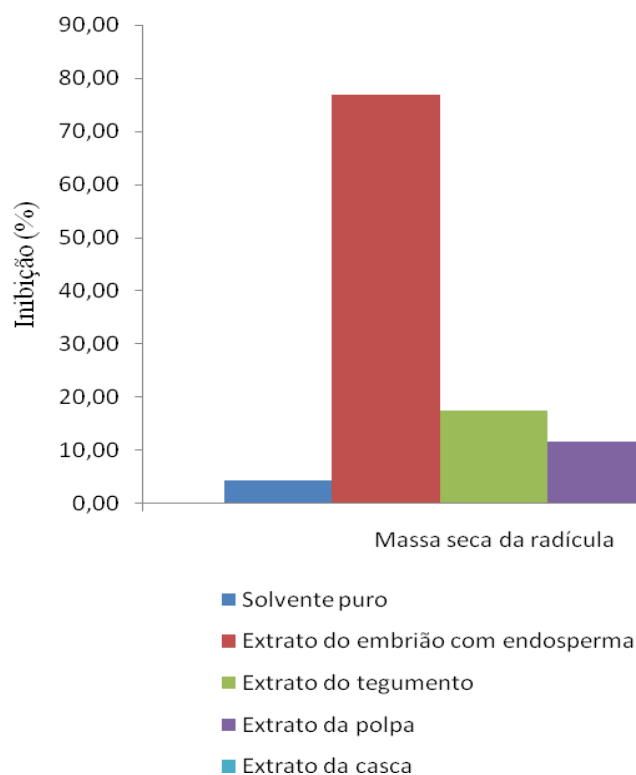


Figura 7 Porcentagem de inibição da massa seca da radícula de plântulas de brócolis (*Brassica oleraceae*) submetidas a extratos elaborados com acetato de etila e acetato de etila puro.

### 3.3 Bioensaio realizado com tomate

Neste bioensaio, o extrato metanólico da casca apresentou maior potencial inibitório para a maioria dos parâmetros estudados. Sementes expostas a esse tratamento apresentaram a menor porcentagem de germinação e IVG (Figura 8), com valores correspondentes a 21% de germinação e 2,29 de IVG (Tabela 3).

Tabela 3 Porcentagem de germinação (% G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento do hipocótilo (CH), comprimento da radícula (CR), massa fresca do hipocótilo (MFH), massa fresca da radícula (MFR), massa seca do hipocótilo (MSH) e massa seca da radícula (MSR) de tomate (*Solanum lycopersicum*) em função de diferentes extratos de *Annona crassiflora* Mart. e água

Tratamentos	% G	IVG	CH	CR	MFH	MFR	MSH	MSR
Água	88 a	15,77 a	4,67 a	2,43 a	23,61 a	3,49 a	1,85 a	0,24 a
Metanol	93 a	15,89 a	4,81 a	2,74 a	24,11 a	3,27 a	1,80 a	0,22 a
Acetato de Etila	91,5 a	14,41 b	3,19 b	1,72 b	16,84 b	1,83 b	1,74 a	0,19 a
Hexano	93 a	18,00 a	5,33 a	3,10 a	25,30 a	3,17 a	1,79 a	0,21 a
Embrião e Endosperma + Metanol	90 a	13,02 b	1,75 c	0,48 c	10,83 c	1,43 b	1,64 a	0,18 a
Tegumento + Metanol	84 a	11,04 c	3,24 b	1,77 b	18,06 b	3,11 a	1,93 a	0,30 a
Polpa + Metanol	60,5 b	7,77 d	2,22 c	0,73 c	13,96 b	2,17 b	1,80 a	0,17 a
Casca + Metanol	21 c	2,29 e	1,01 c	0,50 c	7,695 c	1,16 b	1,80 a	0,17 a
Embrião e Endosperma + Acetato de Etila	90,5 a	13,68 b	2,72 b	0,93 c	16,05 b	1,42 b	1,94 a	0,14 a
Tegumento + Acetato de Etila	91 a	12,69 b	2,93 b	1,25 b	17,09 b	2,44 b	1,97 a	0,20 a
Polpa + Acetato de Etila	80,5 a	11,29 c	2,81 b	1,11 c	15,48 b	2,01 b	1,91 a	0,17 a
Casca + Acetato de Etila	49 b	5,46 d	1,87 c	0,86 c	11,34 c	1,16 b	1,98 a	0,18 a
Embrião e Endosperma + Hexano	88,5 a	16,63 a	4,75 a	1,56 b	21,93 a	2,18 b	1,81 a	0,20 a
Tegumento + Hexano	92 a	16,75 a	4,07 a	1,60 b	20,60 a	2,13 b	1,75 a	0,18 a
Polpa + Hexano	89,5 a	17,40 a	4,42 a	1,53 b	22,19 a	2,32 b	1,88 a	0,18 a
Casca + Hexano	91,5 a	17,93 a	4,76 a	2,65 a	22,92 a	2,72 a	1,71 a	0,21 a
CV (%)	10,92	14,76	27,88	28,25	22,35	28,65	9,64	27,62

Médias seguidas de mesma letra na coluna pertencem a um mesmo grupo e não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

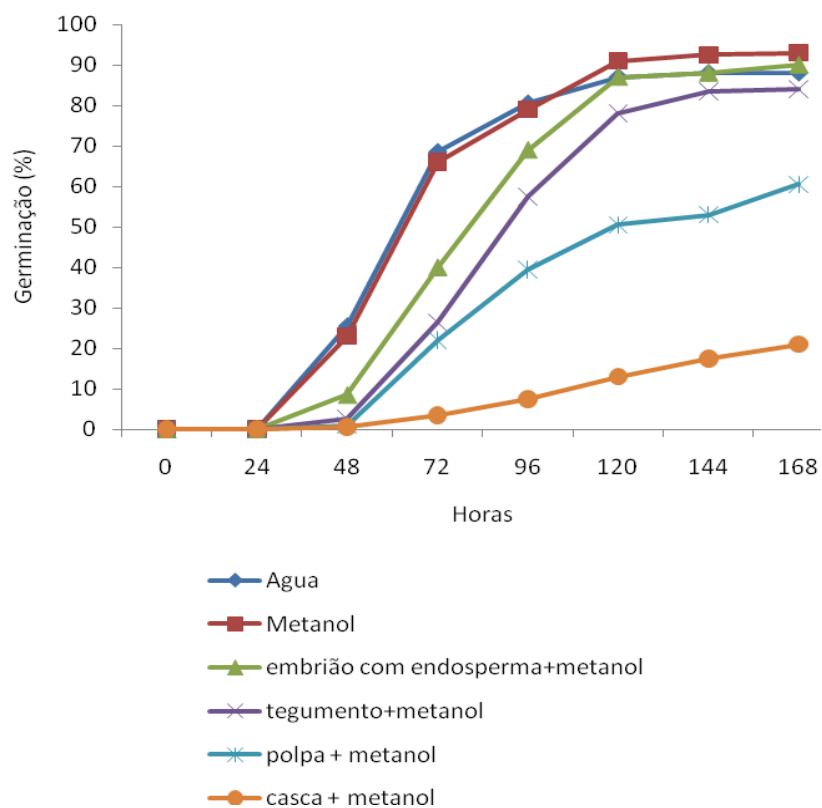


Figura 8 Porcentagem de germinação acumulada de sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*), com aplicação de extratos metanólicos, água e metanol puro, medidos ao longo de sete dias, em intervalos de 24 horas

Os menores valores de comprimento do hipocótilo foram obtidos com extratos metanólicos da casca, embrião com endosperma e polpa, assim como o extrato da casca em meio de acetato de etila.

Dentre eles o extrato metanólico da casca apresentou menor valor numérico de comprimento de hipocótilo (Tabela 3), com valor médio de 1,01 cm, o que representa inibição de 78,41% (Figura 9).

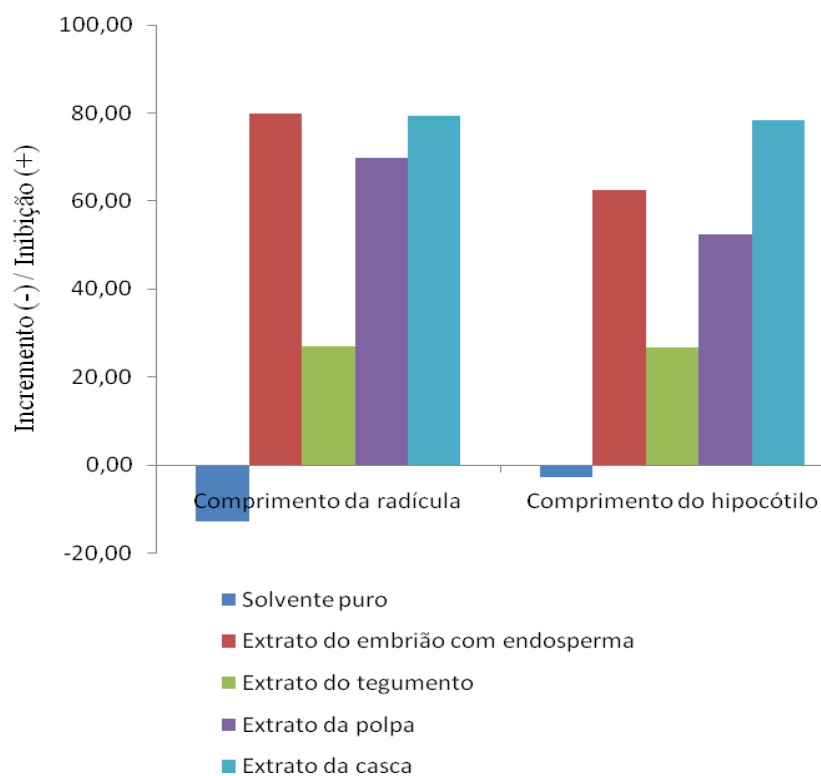


Figura 9 Porcentagem de incremento (negativo) e inibição (positivo) do comprimento da radícula e hipocótilo de plântulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) submetidas a extratos metanólicos e metanol puro

O comprimento da radícula foi inibido em maior intensidade pelos extratos do embrião com endosperma, casca e polpa elaborados com metanol e acetato de etila, tais tratamentos apresentaram valores que variaram de 0,48 cm a 1,11 cm (Tabela 3) e não diferiram estatisticamente entre si.

Os tratamentos que apresentaram maior potencial de inibição da massa fresca do hipocótilo foram os extratos metanólicos da casca e do embrião com endosperma e o extrato da casca em meio de acetato de etila.

O extrato metanólico da casca apresentou menor valor numérico de massa fresca do hipocótilo, no valor de 7,69 mg, o que corresponde a inibição de 67,42% (Figura 11).

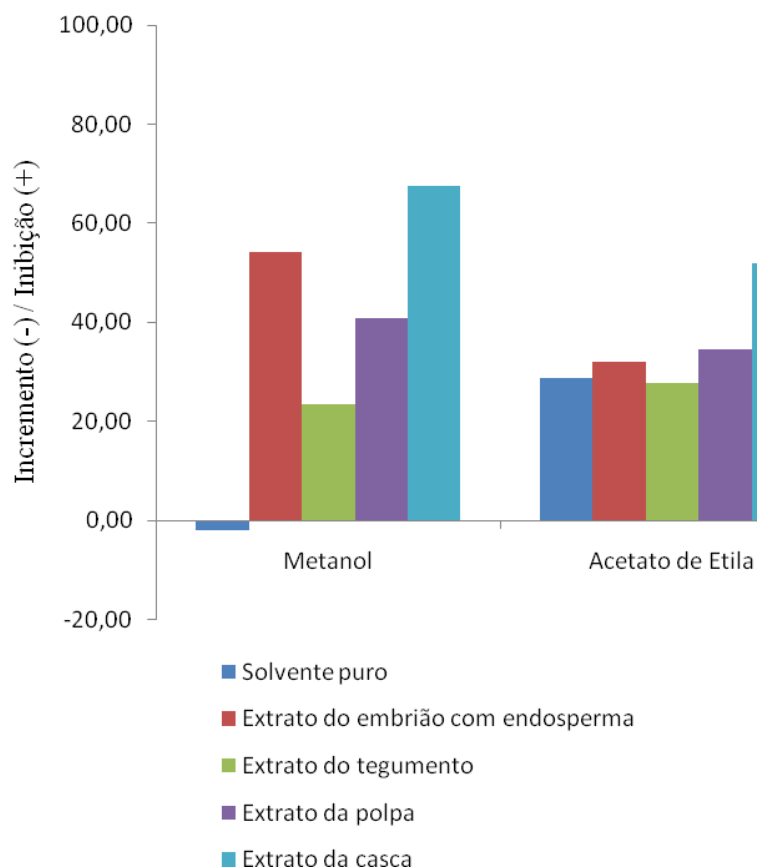


Figura 11 Porcentagem de incremento (negativo) e inibição (positivo) da massa fresca do hipocótilo de plântulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) submetidas a extratos metanólicos e em meio de acetato de etila, assim como aos respectivos solventes puros

Os extratos da casca elaborados com metanol e acetato de etila foram os que promoveram maior inibição da massa fresca da radícula, contudo, o extrato elaborado com acetato de etila não diferiu estatisticamente do solvente puro, não



sendo possível atribuir seu efeito aos componentes da casca. O extrato metanólico da casca promoveu inibição correspondente a 66%.

Os valores de massa seca média do hipocótilo e massa seca média da radícula não apresentaram diferença significativa. Sendo este parâmetro pouco afetado pelos extratos.

### **3.4 Caracterização dos extratos por meio de espectrometria de massas por “electrospray” (ESI-MS)**

Foram gerados espectros de massa para todos os extratos à base de acetato de etila e metanol. Contudo serão analisados apenas dois espectros, já que promoveram maior efeito inibitório, sendo o extrato do embrião com endosperma em meio de acetato de etila o que promoveu maior inibição em plântulas de alface e brócolis e o extrato metanólico da casca o de maior efeito inibidor sobre o tomate, o que pode ser observado no Quadro 1.

Quadro 1 Tratamentos mais efetivos na inibição da porcentagem de germinação (% G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento do hipocótilo (CH), comprimento da radícula (CR), massa fresca do hipocótilo (MFH), massa fresca da radícula (MFR), massa seca do hipocótilo (MSH) e massa seca da radícula (MSR) nos bioensaios realizados com alface (*Lactuca sativa*), brócolis (*Brassica oleraceae*) e tomate (*Solanum lycopersicum*)

	Alface		Brócolis		Tomate	
	Parte do Fruto	Solvente	Parte do Fruto	Solvente	Parte do Fruto	Solvente
% G	Embrião com Endosperma	AE	Embrião com Endosperma	AE	Casca	M
IVG	Embrião com Endosperma	AE	Embrião com Endosperma, Casca	AE	Casca	M
CH	Embrião com Endosperma	AE	Embrião e Endosperma	AE	Embrião com Endosperma, Polpa, Casca	M
					Casca	AE
CR	Embrião com Endosperma	AE	Embrião com Endosperma, Tegumento, Casca	AE	Embrião com Endosperma, Polpa, Casca	AE
			Embrião com Endosperma, Tegumento, Polpa, Casca	M	Embrião com Endosperma, Polpa, Casca	M
			Embrião com Endosperma	H		
MFH	Embrião com Endosperma	AE	Embrião com Endosperma	AE	Casca	AE
					Embrião com Endosperma, Casca	M
MFR	Embrião com Endosperma	AE	-		Casca	AE
					Embrião com Endosperma, Polpa, Casca	M
					Embrião com Endosperma, Tegumento, Polpa	H
MSH	Embrião com Endosperma	AE	-			

“continua”

Quadro 1 “conclusão”

	Alface		Brócolis		Tomate	
	Parte do Fruto	Solvente	Parte do Fruto	Solvente	Parte do Fruto	Solvente
MSR	Embrião com Endosperma	AE	Embrião com Endosperma, Casca	AE	-	
			Polpa	M		

M: Metanol; AE: Acetato de Etila; H: Hexano

Por meio de comparações com dados na literatura foram identificados compostos com possível ação alelopática, porém para comprovação dos supostos compostos encontrados deverá ser realizada a fragmentação dos íons por meio da técnica MS/MS. Por esse motivo será sugerida a presença de determinadas moléculas por semelhança na relação m/z.

Nas Figuras 12 e 13 os sinais (picos) correspondem a moléculas do tipo [M-H]<sup>-</sup>.

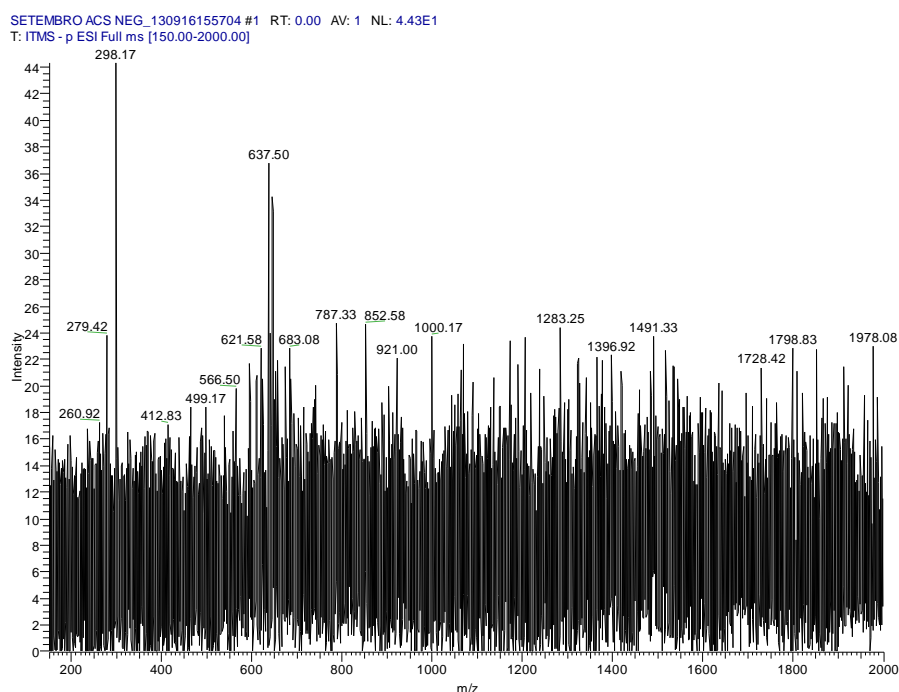


Figura 12 Espectro de massas por electrospray do extrato do embrião com endosperma em meio de acetato de etila, avaliado no modo negativo.

No extrato do embrião com endosperma em meio de acetato de etila foi possível identificar nove possíveis moléculas (Quadro 2).

Quadro 2 Relação m/z dos íons [M-H]<sup>-</sup> e possível identificação de compostos detectados por ionização por “electrospray” (ESI-MS) na análise do extrato da semente de *A. crassiflora* em meio de acetato de etila

Relação m/z	Identificação Sugerida	Referência
260	“Dodeca-2,4,8,10-tetraenoic acid 2-methylbutylamide”	Mudge et al. (2011)
279	“p- Coumaroyl malate”	Narváez-Cuenca et al. (2013)
298	“Pentadeca-2E,9Z-diene-12,14-diynoic acid 2-methylbutylamide”	Mudge et al. (2011)
412	“Stigmasterol”	Kpoviessi et al. (2006)
499	“5 -O - Coumaroyl caffeoylquinic acid”	Gouveia et al. (2013)
621	“Acetyl naringin”	Zhang et al. (2011)
637	“Luteolin diglucoronide”	Huvaere et al. (2012)
683	“Rosmarinic acid dihexoside derivative”	Negri et al. (2011)
787	“Quercetin-3-O-sophoroside-7-O-D-glucoside”	Schmidt et al. (2010)

Foram considerados sinais de maior confiabilidade aqueles cujo comprimento estava próximo a três vezes a medida do ruído em seu espectro de referência. Os sinais de maior confiabilidade correspondem ao “Pentadeca-2E, 9Z-diene-12,14-diynoic acid 2-methylbutylamide” (m/z=298), e a “Luteolin diglucoronide” (m/z=637).

Na Figura 13 está representado o espectro gerado com a análise do extrato metanólico da casca.

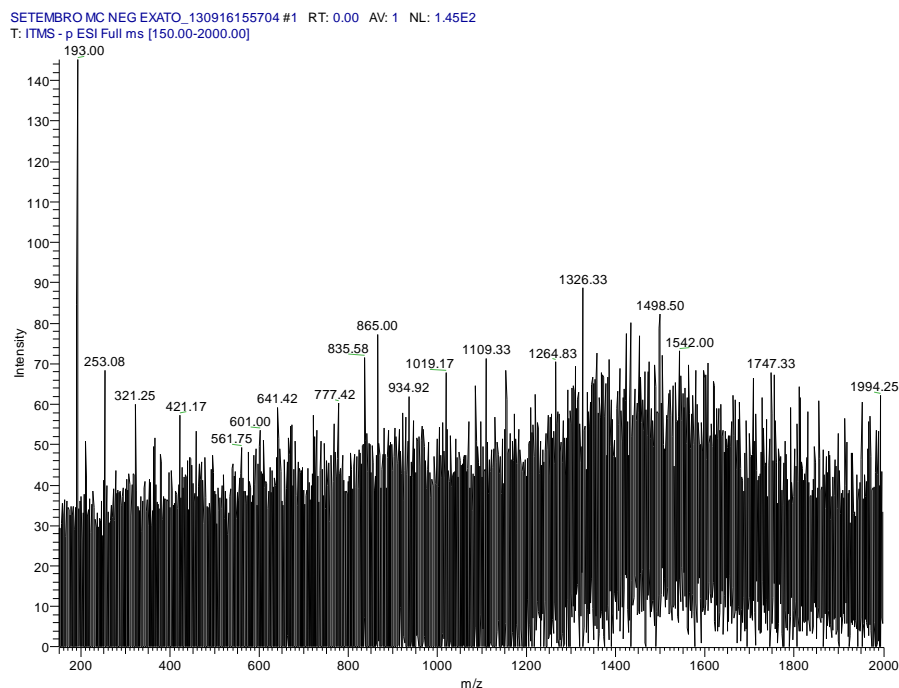


Figura 13 Espectro de massas por electrospray do extrato metanólico da casca do fruto de *A. crassiflora*, avaliado no modo negativo

Neste espectro foi possível a identificação de 11 compostos com base na literatura (Quadro 3), porém apenas “Ferulic acid” ( $m/z=193$ ) e “Chrysin” ( $m/z=253$ ) apresentaram sinal de intensidade adequada.

Tabela 6 Relação  $m/z$  dos íons  $[M-H]^-$  e possível identificação de compostos detectados por ionização por “electrospray” (ESI-MS) na análise do extrato metanólico da casca de *Annona crassiflora* Mart

Relação $m/z$	Identificação Sugerida	Referência
193	“Ferulic acid”	Garret et al. (2012)
253	“Chrysin”	Wang et al. (2008)
321	“Oxygenated catechin”	Huvaere et al. (2012)
421	“Mangiferin”	Rainha et al. (2012)
561	“Catechin dimmer”	Atoui et al. (2005)
601	“Elenolic acid”	Eyles et al. (2007)

“continua”

Tabela 6 “conclusão”

<b>Relação m/z</b>	<b>Identificação Sugerida</b>	<b>Referência</b>
641	“Quercetagenin 7- O caffeylglucoside”	Parejo et al. (2004)
777	“Tri- caffeoyl succinoyl quinic acid”	Simirgiotis et al. (2012)
865	“Procyanidin trimer”	Reis et al. (2012)
934	“Cyanidin 3-(600-caffeoyl sophoroside)-5-glucoside”	Kim et al. (2012)
1109	“Kaempferol-3-O-feruloyl-sophoroside-7-O-diglucoside”	Schmidt et al. (2010)

#### 4 DISCUSSÃO

A heterogeneidade de respostas biológicas sugere que o potencial de inibição dos extratos depende do solvente que o constitui, da parte do fruto utilizado em sua elaboração e da espécie bioindicadora avaliada. A diversidade de compostos presentes nas partes do fruto, as diferentes capacidades de extração dos solventes e as diferenças de volume e constituição das sementes são fatores que tornam as respostas biológicas processos específicos (PELLISSIER, 2013), portanto de complexa comparação. Como foi o caso do extrato do embrião com endosperma em meio de acetato de etila que promoveu intensa inibição da germinação de alface e brócolis, porém, não inibiu a germinação do tomate.

Com isso, as características genéticas individuais das espécies bioindicadoras devem ser levadas em conta, já que favorecem maior ou menor sensibilidade do organismo a determinado composto (XUAN; TSUZUKI, 2002).

A inibição do processo germinativo, por meio da exposição ao extrato de sementes de *Annona crassiflora*, foi relatado por Ribeiro et al. (2013), onde sementes de alface (*Lactuca sativa*) expostas ao extrato da semente na concentração de 1,2 mg/L apresentaram 13,56% de germinação. Neste trabalho, a alface apresentou 1% de germinação, isso se deve a maior proporção do tecido vegetal utilizado na elaboração do extrato, conforme metodologia anteriormente descrita.

Aleloquímicos podem influenciar a germinação por diferentes mecanismos (MUSCOLO; PANUCCIO; SIDARI, 2001; WEIR; BAIS; VIVANCO, 2003), geralmente a inibição ocorre pela interrupção ou redução da respiração, atividade enzimática e atividade glicolítica, processos diretamente relacionados com a mobilização dos componentes de reserva. A interrupção do



acesso à fonte energética no desenvolvimento e crescimento inicial da planta pode resultar na morte da semente (WEIR; PARK; VIVANCO, 2004).

A avaliação prévia da eficiência de extratos vegetais na inibição do crescimento de plantas é um ponto chave quando se deseja realizar a integração de plantas de potencial alelopático com métodos tradicionais de controle de plantas daninhas, sendo assim, para o estudo inicial os bioensaios são amplamente utilizados.

Omezzine & Haouala (2013) relataram a inibição promovida por extratos de *Trigonella foenum-graecum* L. sobre o comprimento da parte aérea de plântulas de alface, tal inibição variou de 50 a 83%, dependendo do solvente utilizado e estágio fenológico da planta fonte de aleloquímicos.

Xu et al. (2013) avaliaram o efeito de compostos fenólicos extraído de raízes *Mikania micrantha* sobre a germinação e crescimento de *Arabidopsis thaliana* e identificaram diversos compostos que inibiram o crescimento da parte aérea em até 96%.

Por meio dos resultados obtidos é possível averiguar que houve inibição expressiva sobre caracteres de crescimento das espécies bioindicadoras, comprovando que sob condições de laboratório a espécie *A. crassiflora* Mart. é uma fonte potencial de aleloquímicos com ação supressora sobre outras espécies vegetais. Contudo, são necessários estudos para verificar a eficácia dos mesmos sob condições de campo, e, com isso a possibilidade de sua integração aos métodos de manejo de plantas daninhas, pois devido à complexidade de interações bióticas e abióticas que ocorrem em ambiente natural, sem essa avaliação, não se pode garantir que extratos vegetais manterão sua eficiência como apresentado em condições de laboratório. A utilização de extratos vegetais com comprovada capacidade inibitória pode trazer redução no volume de herbicidas, representando um relativo ganho ambiental e redução nos custos de produção.

Jabran et al. (2010) obtiveram efeito satisfatório no controle de plantas daninhas combinando extratos de sorgo (*Sorghum bicolor* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.), mustarda (*Brassica campestris* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.) a uma dose reduzida do herbicida Pendimethalin. Essa combinação permitiu a redução em 50% do consumo do herbicida no manejo de lavoura de canola (*Brassica napus*). Resultado semelhante foi obtido por Iqbal, Cheema e Mushtaq (2009) no manejo do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*).

Cheema, Jaffer e Khaliq (2003) também verificaram a viabilidade em se reduzir 50% do volume gasto de Isoproturon no manejo de espécies daninhas do trigo, ao se combinar herbicida com extrato de sorgo (*Sorghum bicolor* L.). A produção obtida com esse método foi bem próxima à produção obtida com o manejo convencional.

Alguns aleloquímicos possuem a capacidade de interferir no crescimento e desenvolvimento da planta, através de diferentes mecanismos, muitos deles ainda desconhecidos. Dentre os mais estudados e conhecidos pode-se citar os mecanismos de alteração da permeabilidade de membrana e alteração da capacidade de absorção de íons, os quais podem promover a desaceleração do crescimento e morte do tecido (LI et al., 2010).

O extrato de embrião com endosperma em meio de acetato de etila inibiu a maior parte dos caracteres avaliados em duas das três espécies bioindicadoras utilizadas. Esse resultado amplo e generalizado está de acordo com os apresentados por Inoue et al. (2010a), onde duas substâncias isoladas do extrato acetato de etila da semente de *A. crassiflora* (estigmasterol glicosilado e sitosterol glicosilado) apresentaram potencial de inibição do crescimento da parte aérea e radicular de plantas de *Euphorbia heterophylla*.

Levizou et al. (2002) apresentaram o efeito alelopático do extrato aquoso da folha da espécie *Dittrichia viscosa* sobre plântulas de alface. Apesar de o sistema radicular ter sido mais afetado em seu comprimento do que em

massa, as plantas tratadas com extrato apresentaram redução na massa da radícula em torno de 30%. Aparentemente, os aleloquímicos presentes no extrato induziram um encurtamento e engrossamento da raiz, afetando em menor magnitude a massa da radícula.

Raízes submetidas à aleloquímicos geralmente tem seu crescimento longitudinal inibido devido à redução do processo de divisão celular. Tal inibição pode promover um engrossamento desse órgão em detrimento ao alongamento longitudinal, assim como estimular o desenvolvimento de pelos radiculares (ROMERO-ROMERO et al., 2005), o que pode explicar a maior alteração do comprimento das raízes em relação a menor alteração na massa das raízes em todos os bioensaios.

Aleloquímicos podem agir pela inibição de enzimas específicas, distúrbios no balanço hormonal, supressão da divisão e alongamento celular. Esses mecanismos estão intrinsecamente relacionados ao crescimento radicular (RICE, 1984).

Magalhães et al. (2012) descreveram drástica redução do crescimento radicular com a aplicação de extratos metanólicos do endosperma de *Butia capitata*. Tal redução foi correlacionada com a presença de compostos com capacidade de interrupção da translocação de hormônios vegetais, mais especificamente auxinas. Segundo esses autores, há a possibilidade de metabólitos secundários presentes no extrato estarem agindo de forma análoga a flavonóides, alterando o equilíbrio hormonal. Dentre suas inúmeras atividades, os flavonóides podem atuar na regulação do transporte e degradação de auxinas, tendo efeito direto no crescimento radicular (WESTON; MATHESIUS, 2013).

Em vista da especificidade dos resultados, percebe-se a importância da análise das respostas biológicas de diferentes espécies, já que a sensibilidade a determinado composto alelopático é um fator variável entre espécies (BELZ; HURLE, 2004; NASIR et al., 2005).

Apesar de todas as partes do fruto terem promovido algum grau de inibição, o embrião com endosperma em meio de acetato de etila inibiu maior número de parâmetros no bioensaio realizado com alface e brócolis, enquanto o extrato metanólico da casca foi o responsável pela inibição de maior número de caracteres em tomate. Baseado nessas informações será dado enfoque a esses dois extratos de maior potencial alelopático.

#### Componentes identificados

No extrato do embrião com endosperma em meio de acetato de etila os sinais de maior intensidade referem-se aos compostos “Pentadeca-2E,9Z-diene-12,14-diynoic acid 2-methylbutylamide” ( $m/z= 298$ ) e “Luteolin diglucoronide” ( $m/z= 637$ ) .

O composto “Pentadeca-2E,9Z-diene-12,14-diynoic acid 2-methylbutylamide” ( $m/z= 298$ ) pertence ao grupo das Alquilamidas, que são moléculas biotivas, originadas do metabolismo secundário, presentes em mais de 100 espécies, exercem diversas funções biológicas, atuando como componentes biocidas com papel de proteção contra agentes bióticos (BOONEN et al., 2012) e sua atividade inseticida foi previamente relatada por Ottea, Payne e Soderlund (1990).

O composto “Luteolin diglucoronide” ( $m/z= 637$ ) é um flavonóide pertencente à classe das flavonas, possui atividade indutora do gene *Nod* (COOPER, 2004) e está relacionada à quimiotaxia positiva com microorganismos simbióticos, ou negativa com parasitóides de solo (WUYTS; SWENNEN; DE WAELE, 2006), contudo não há relatos de ação exclusivamente alelopática desse composto isoladamente.

Alguns flavonóides possuem atividade alelopática reconhecida (KONG et al., 2007), porém pouco se sabe sobre seus mecanismos de ação alelopática. As diferentes formas de assimilação e transporte desses compostos assim como modificações em sua estrutura promovidas por microorganismos do solo são

fatores que determinam sua eficiência na inibição de determinado organismo e podem explicar a especificidade de ação em diferentes espécies de plantas (WESTON ; MATHESIUS, 2013), o que pode ser relacionado aos diferentes níveis de suscetibilidade das espécies bioindicadoras, submetidas ao extrato do embrião com endosperma em meio de acetato de etila neste trabalho.

No extrato metanólico da casca os compostos identificados com maior intensidade foram “Ferulic acid” (m/z= 193) e “Chrysin” (m/z= 253).

O efeito alelopático do ácido ferúlico (“Ferulic acid”) já é de conhecimento comum (DOS SANTOS; FERRARESE; FERRARESE-FILHO, 2008). É considerado aleloquímico capaz de promover a redução do desenvolvimento da planta por meio de diversos mecanismos como interrupção de absorção de nutrientes, redução da taxa fotossintética e na capacidade de utilização de água (SIQUEIRA et al., 1991). O ácido ferúlico é um forte inibidor do alongamento sistema radicular e parte aérea, o que pode explicar os resultados obtidos no bioensaio realizado com tomate. Plântulas de alface e brócolis foram menos suscetíveis a esse extrato, resultado nada inusitado, já que diferentes espécies apresentam muitas vezes repostas antagônicas a um mesmo composto fenólico (REIGOSA; PAZOS-MAVIDO, 2007).

O flavonóide “Chrysin” (m/z= 253) é uma flavona cujo potencial alelopático também já foi relatado. De Martino et al. (2012) apresentaram seu efeito fitotóxico *in vitro*, onde promoveu a inibição do crescimento radicular de rabanete. Também há indícios de seu potencial de inibição da germinação (SHALABY, 2001).

Desta forma, por meio da resposta biológica aos extratos vegetais foi mensurado o potencial fitotóxico de determinadas partes do fruto. Em seus respectivos extratos foi possível caracterizar alguns aleloquímicos de ação inibidora comprovada.

Porém, uma análise mais apurada, com a otimização do processo de leitura cromatográfica, assim como o isolamento de moléculas específicas, será possível ampliar o conhecimento das fontes de maior ou menor efeito supressor, possibilitando o desenvolvimento de novas moléculas de ação herbicida e através de testes em condição de campo será possível avaliar a eficiência dos extratos vegetais e comprovar o real potencial de integração dessa espécie ao manejo de plantas daninhas.

## 5 CONCLUSÃO

O fruto de *A. crassiflora* contém compostos com capacidade de inibir a germinação, crescimento e desenvolvimento de alface (*Lactuca sativa*), brócolis (*Brassica oleracea*) e tomate (*Solanum lycopersicum*).

Dentre as partes do fruto, a semente possui maior potencial de inibição de alface (*Lactuca sativa*) e brócolis (*Brassica oleracea*), enquanto a casca apresenta maior potencial de inibição de tomate (*Solanum lycopersicum*).

Estão presentes nos extratos analisados diversos compostos, dentre eles o pentadeca-2E,9Z-diene-12,14-dienoic acid 2-methylbutylamide ( $m/z=298$ ), luteolin diglucoronide ( $m/z=637$ ), ferulic acid ( $m/z= 193$ ) e chrysin ( $m/z= 253$ ).

## REFERÊNCIAS

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005

BASSETTI, L.; TRAMPER, J. Organic solvent toxicity in *Morinda citrifolia* cell suspensions. **Enzyme and microbial technology**, v. 16, n. 8, p. 642-648, 1994.

BATISH, D.R.; ARORA, K; SINGH, H.P.; KOHLI, R.K. Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. **Crop Prot** 26:566–571 (2007).

BELZ, R. G.; HURLE, K. A novel laboratory screening bioassay for crop seedling allelopathy. **Journal of chemical ecology**, v. 30, n. 1, p. 175-198, 2004.

BOONEN, J; BRONSELAER, A.; NIELANDT, J.; VERYSER, L.; TRÉ, G. D.; SPIEGELEER, B. D. Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant *N*- alkylamides. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 563-590, 2012.

BRANNSTROM, C.; JEPSON, W.; FILIPPI, A. M.; REDO, D.; XU, Z.; GANESH, S. Land change in the Brazilian Savanna (Cerrado), 1986–2002: comparative analysis and implications for land-use policy. **Land Use Policy**, v. 25, n. 4, p. 579-595, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 2009. 399 p.

CHEEMA, Z.; JAFFER, I.; KHALIQ, A. Reducing isoproturon dose in combination with sorgaab for weed control in wheat. **Pak J Weed Sci Res**, v. 9, p. 153-160, 2003.

COOPER, J. E. Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. **Advances in botanical research**, v. 41, p. 1-62, 2004.

CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.



DAMIANI, C.; VILAS BOAS, E. V. B.; ASQUIERI, E. R.; LAGE, M. E.; OLIVEIRA, R. A.; SILVA, F. A.; PINTO, D. M.; RODRIGUES, L. J.; SILVA, E. P.; PAULA, N. R. F. Characterization of fruits from the savanna: Araça (*Psidium guinnensis* Sw.) and Marolo (*Annona crassiflora* Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 723-729, 2011.

DE MARTINO, L.; MENCHERINI, T.; MANCINI, E.; AQUINO, R. P.; DE ALMEIDA, L. F. R.; DE FEO, V. In vitro phytotoxicity and antioxidant activity of selected flavonoids. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 5, p. 5406-5419, 2012.

DE OMENA, M. C.; NAVARRO, D.M.A.F; DE PAULA, J. E; LUNA, J. S, DE LIMA, M. R. F.; SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2549-2556, Sep 2007.

DOS SANTOS, W. D.; FERRARESE, M.; FERRARESE-FILHO, O. Ferulic acid: an allelochemical troublemaker. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 47-55, 2008.

ESCUADERO, A.; ALBERT, M. J.; PITA, J. M.; PEREZ-GARCIA, F. Inhibitory effects of *Artemisia herba-alba* on the germination of the gypsophyte *Helianthemum squamatum*. **Plant ecology**, v. 148, p. 71-80, 2000.

EYLES, A.; JONES, W.; RIEDL, K.; CIPOLLINI, D.; SCHWARTZ, S.; CHAN, K; HERMS, D. A.; BONELLO, P. Comparative phloem chemistry of Manchurian (*Fraxinus mandshurica*) and two North American ash species (*Fraxinus americana* and *Fraxinus pennsylvanica*). **Journal of chemical ecology**, v. 33, n. 7, p. 1430-1448, 2007.

FANALI, C.; DUGO, L.; CACCIOLA, F.; BECCARIA, M.; GRASSO, S.; DACHA, M.; DUGO, P.; MONDELLO, L. Chemical characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 24, p. 13043-13049, 2011.

FAROOQ, M.; JABRAN, K.; CHEEMA, Z.A.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K.H.M. The role of allelopathy in agricultural pest management. **Pest Management Science**, v. 67, n. 5, p. 493-506, May 2011.

GARRETT, R.; SCHMIDT, E. M.; PEREIRA, L. F. P.; KITZBERGER, C. S.; SCHOLZ, M. B. S.; EBERLIN, M. N.; REZENDE, C. M. Discrimination of arabica coffee cultivars by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and chemometrics. **LWT-Food Science and Technology**, 2012. p. 496-502

GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A.; CABONI, M. F. Simultaneous Determination of Phenolic Compounds and Saponins in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) by a Liquid Chromatography–Diode Array Detection–Electrospray Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry Methodology. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 20, p. 10815-10825, 2011.

GOUVEIA, S.; GONÇALVES, J.; CASTILHO, P. C. Characterization of phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts from flowers of *Andryala glandulosa* ssp. *varia* (Lowe ex DC.) R. Fern., an endemic species of Macaronesia region. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 573-582, 2013

HERRERA, C. M. Defense of ripe fruit from pests: its significance in relation to plant-disperser interactions. **American Naturalist**, p. 218-241, 1982.

HUVAERE, K.; SINNAEVE, B.; VAN BOCXLAER, J.; SKIBSTED, L. H. Flavonoid deactivation of excited state flavins: reaction monitoring by mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9261-9272, 2012.

INOUE, M. H.; SANTANA, D. C.; VILHENA, K. S. S.; SOUZA FILHO, A.P.S; GUILHON, G.M.S.P.; POSSAMAI, A.C.S.; SILVA, L.E.; DALLACORT, R. Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de araticum (*Annona crassiflora*). **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 735-741, 2010a.

INOUE, M.; SANTANA, D. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; POSSAMAI, A. C. S.; SILVA, L. E.; PEREIRA, M. J. B.; PEREIRA, K. M. Potencial alelopático de *Annona crassiflora*: efeitos sobre plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 489-498, 2010b.

IQBAL, J.; CHEEMA, Z.A.; MUSHTAQ, M.N. Allelopathic crop water extracts reduce the herbicide dose for weed control in cotton (*Gossypium hirsutum*). **Internat J Agric Biol**, v. 11, p. 360–366, 2009.

JABRAN, K. CHEEMA, Z. A.; FAROOQ, M.; HUSSAIN, M. Lower doses of pendimethalin mixed with allelopathic crop water extracts for weed management in canola (*Brassica napus*). **Int J Agric Biol**, v. 12, p. 335-340, 2010.

KIM, H. W.; KIM, J. B.; CHO, S. M.; CHUNG, M. N.; LEE, Y. M.; CHU, S. M.; CHE, J. H.; KIM, S. N., CHO, Y. S.; KIM, J. H.; PARK, H. J.; LEE, D. J. Anthocyanin changes in the Korean purple-fleshed sweet potato, Shinzami, as affected by steaming and baking. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 966-972, 2012.

KONG, C.; ZHAO, H.; XU, H.; WANG, P.; GU, Y. Activity and allelopathy of soil of flavone O-glycosides from rice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6007-6012, 2007.

KPOVIESSI, D. S. S.; GDUGUIDI, F. A.; GBENOU, J. D.; ACCROMBESSI, G. C.; HADDAD, M.; MOUDACHIREU, M.; LEDERCO, J. Q. Allelopathic effects on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) plant and cytotoxic activities of sterols and triterpene isolated from *Justicia anselliana* (NEES) T. **Electr J Nat Subst**, v. 1, p. 12-19, 2006.

LEVIZOU, E.; KARAGEORGOU, P.; PSARAS, G. K.; MANETAS, Y. Inhibitory effects of water soluble leaf leachates from *Dittrichia viscosa* on lettuce root growth, statocyte development and graviperception. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 197, n. 2, p. 152-157, 2002.

LI, Z. H.; WANG, Q.; RUAN, X.; PAN, C. D.; JIANG, D. A. Phenolics and plant allelopathy. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8933-8952, 2010.

MACIAS, F. A.; MOLINILLO, J. M. G. ; VARELA, R. M.; GALINDO, J. C. G. Allelopathy - a natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, v. 63, n. 4, p. 327-348, 2007.

MAGALHÃES, H.; LOPES, P. S. N.; SILVERIO, F. O.; SILVA, H. F. J. Effects of *Butia Capitata* pyrenes extracts on the germination of lettuce seeds. **Allelopathy Journal**, v. 30, n. 1, p. 49-60, 2012.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination—aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962

MUDGE, E.; LOPES-LUTZ, D.; BROWN, P.; SCHIEBER, A. Analysis of alkylamides in Echinacea plant materials and dietary supplements by ultrafast liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 15, p. 8086-8094, 2011.

MULABAGAL, V.; CALDERÓN, A. I. Liquid chromatography/mass spectrometry based fingerprinting analysis and mass profiling of *Euterpe oleracea* (açai) dietary supplement raw materials. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1156-1164, 2012.

MUSCOLO, A.; PANUCCIO, M.; SIDARI, M. The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination. **Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 1, p. 31-35, 2001.

NARVÁEZ-CUENCA, C. E.; VINCKEN, J. P.; ZHENG, C.; GRUPPEN, H. Diversity of (dihydro) hydroxycinnamic acid conjugates in Colombian potato tubers. **Food Chemistry**, 2013. p. 1087-1097.

NASCIMENTO, G. N. L. D.; VALADARES, M. C.; NISHIJO, H.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Investigation of the toxic potential of crude ethanol extract of *Annona coriacea* (araticum) seeds in acute exposed mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 580-586, 2012.

NASIR, H.; IQBAL, Z.; HIRADATE, S.; FUJII, Y. Allelopathic Potential of *Robinia pseudo-acacia* L. **Journal of chemical ecology**, v. 31, n. 9, p. 2179-2192, 2005.

NEGRI, G. TEIXEIRA, E. W.; FLORÊNCIO ALVES, M. L. T. M.; MORETI, A. C. D. C. C.; OTSUK, I. P.; BORGUINI, R. G.; SALATINO, A. Hydroxycinnamic acid amide derivatives, phenolic compounds and antioxidant activities of extracts of pollen samples from southeast Brazil. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5516-5522, 2011.

OMEZZINE, F.; HAOUALA, R. Effect of *Trigonella foenum-graecum* L. development stages on some phytochemicals content and allelopathic potential. **Scientia Horticulturae**, v. 160, p. 335-344, 2013.

OTTEA, J. A.; PAYNE, G. T.; SODERLUND, D. M. Action of insecticidal N-alkylamides at site 2 of the voltage-sensitive sodium channel. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 38, n. 8, p. 1724-1728, 1990.

PAREJO, I.; JAUREGUI, O.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; CODINA, C.

Characterization of acylated flavonoid-O-glycosides and methoxylated

flavonoids from *Tagetes maxima* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 23, p. 2801-2810, 2004.

PELLISSIER, F. Improved germination bioassays for allelopathy research. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 1, p. 23-30, 2013.

POLLIER, J.; MORREEL, K.; GEELLEN, D.; GOOSSENS, A. Metabolite profiling of triterpene saponins in *Medicago truncatula* hairy roots by liquid chromatography Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Journal of natural products**, v. 74, n. 6, p. 1462-1476, 2011.

RAINHA, N.; KOCI, K.; COELHO, A. V.; LIMA, E., BAPTISTA, J.; FERNANDES-FERREIRA, M. HPLC–UV–ESI-MS analysis of phenolic compounds and antioxidant properties of *Hypericum undulatum* shoot cultures and wild-growing plants. **Phytochemistry**, 2012. p. 83-91.

REIGOSA, M. J.; PAZOS-MALVIDO, E. Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth. **Journal of chemical ecology**, v. 33, n. 7, p. 1456-1466, 2007.

REIS, S. F.; RAI, D. K.; ABU-GHANNAM, N. Water at room temperature as a solvent for the extraction of apple pomace phenolic compounds. **Food Chemistry**, 2012.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2nd ed., New York, Academic Press, 1984. p. 368

RIBEIRO, L. R.; SANTOS, M.F.; SILVA, Q.M.; PALMIERI, M.J.; ANDRADE-VIEIRA, L.F.; DAVIDE, L.C. Cytogenotoxic effects of ethanolic extracts of *Annona crassiflora* (Annonaceae). **Biologia**, v. 68, n. 3, p. 433-438, 2013.

ROESLER, R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 93-100, 2011.

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1048-1054, 2007.

ROMERO-ROMERO, T.; SANCHEZ-NIETO, S.; SANJUAN-BADILLO, A.; ANAYA, A. L.; CRUZ-ORTEGA, R. Comparative effects of allelochemical and water stress in roots of *Lycopersicon esculentum* Mill.(Solanaceae). **Plant science**, v. 168, n. 4, p. 1059-1066, 2005.

SCHMIDT, S. ZIETZ, M.; SCHREINER, M.; ROHN, S.; KROH, L. W.; KRUMBEIN, A. Identification of complex, naturally occurring flavonoid

glycosides in kale (*Brassica oleracea* var. sabellica) by high-performance liquid

chromatography diode-array detection/electrospray ionization multi-stage mass

spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 14, p. 2009-2022, 2010.

SHALABY, A.M. Influence of flavonoid compounds on VA mycorrhiza *Glomus mosseae* and alfalfa plants. **Egypt. J. Microbiol.**, 35, 225–238, 2001.

SIMIRGIOTIS, M. J.; SILVA, M.; BECERRA, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Direct characterisation of phenolic antioxidants in infusions from four Mapuche medicinal plants by liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). **Food Chemistry**, v. 131, n. 1, p. 318-327, 2012.

SINGH, N.; YADAV, K.; AMIST, N. Phytotoxic Effects of Cinnamic Acid on Cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata). **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 9, n. 2, p. 307-317, 2013.

SIQUEIRA, J. O.; NAIR, M. G.; HAMMERSCHMIDT, R.; SAFIR, G. R.;

PUTNAM, A. R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial

systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 10, n. 1, p. 63-121, 1991.

SOLIS, M. V.; PATEL, A.; ORSAT, V.; SINGH, J.; LEFSRUD, M. Fatty acid profiling of the seed oils of some varieties of field peas (*Pisum sativum*) by RP-LC/ESI-MS/MS: Towards the development of an oilseed pea. **Food Chemistry**, 2013. p. 986-993

SOUZA FILHO, A. D. S.; GUILHON, G.; SANTOS, L. D. S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório–revisão crítica. **Planta Daninha, Viçosa**, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.

TOLONEN, A.; UUSITALO, J. Fast screening method for the analysis of total

flavonoid content in plants and foodstuffs by high-performance liquid

chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry with

polarity switching. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 24, p. 3113-3122, 2004.

TORRAS-CLAVERIA, L.; JÁUREGUI, O.; CODINA, C.; TIBURCIO, A. F.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F. Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry in senescent and water-stressed tobacco. **Plant science**, v. 182, p. 71-78, 2012.

VILAR, J.; FERRI, P.; CHEN-CHEN, L. Genotoxicity investigation of araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 197-202, 2011.

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

WEIR, T. L.; BAIS, H. P.; VIVANCO, J. M. Intraspecific and interspecific interactions mediated by a phytotoxin,(-)-catechin, secreted by the roots of *Centaurea maculosa* (spotted knapweed). **Journal of chemical ecology**, v. 29, n. 11, p. 2397-2412, 2003.

WEIR, T. L.; PARK, S.-W.; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current opinion in plant biology**, v. 7, n. 4, p. 472-479, 2004

WESTON, L. A.; MATHESIUS, U. Flavonoids: Their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. **Journal of chemical ecology**, p. 1-15, 2013.

WUYTS, N.; SWENNEN, R.; DE WAELE, D. Effects of plant phenylpropanoid pathway products and selected terpenoids and alkaloids on the behaviour of the plant-parasitic nematodes *Radopholus similis*, *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, v. 8, n. 1, p. 89-101, 2006.

XU, Q.; XIE, H.; XIAO, H.; WEI, X. Phenolic Constituents from the Roots of *Mikania micrantha* and Their Allelopathic Effects. **Journal of agricultural and food chemistry**, 2013. P. 7309-7314

XUAN, T. D.; TSUZUKI, E. Varietal differences in allelopathic potential of alfalfa. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 188, n. 1, p. 2-7, 2002.

YANG, B.; KORTESNIEMI, M.; LIU, P.; KARONEN, M.; SALMINEN, J. P. Analysis of Hydrolyzable Tannins and Other Phenolic Compounds in Emblic Leafflower (*Phyllanthus emblica* L.) Fruits by High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 35, p. 8672-8683, 2012.

ZHANG, M.; DUAN, C.; ZANG, Y.; HUANG, Z.; LIU, G. The flavonoid composition of flavedo and juice from the pummelo cultivar (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and the grapefruit cultivar (*Citrus paradisi*) from China. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1530-1536, 2011.



**ARTIGO 2 Conteúdo de DNA nuclear em populações in situ de *Annona crassiflora* Mart.**

## RESUMO

A fragmentação de habitats traz inúmeras conseqüências, especialmente sobre espécies endêmicas. Tal processo favorece a diminuição de indivíduos e reduz a diversidade genética de espécies sob essa condição. Neste contexto pode-se colocar a espécie *Annona crassiflora* Mart., cuja incidência ao longo das áreas de Cerrado é cada vez menor, tornando válidas medidas de identificação e caracterização da biodiversidade remanescente. Com este trabalho objetivou-se a caracterização do perfil de conteúdo de DNA de populações *in situ* de *A. crassiflora* ao longo do Cerrado mineiro. Foram georreferenciadas populações nos municípios de Corinto, Curvelo, Carmo da Mata, Boa Esperança e Paraguaçu. A estimativa do conteúdo de DNA foi realizada por citometria de fluxo para 10 indivíduos de cada população. Obteve-se correlação positiva significativa entre o conteúdo de DNA e a latitude ( $r = 0,46$ ,  $p = 0,0003$ ). Concluiu-se que existe variabilidade para o caráter conteúdo de DNA em populações situadas sob condições climáticas distintas e que a citometria de fluxo é uma ferramenta prática para detectar variações do conteúdo de DNA nuclear entre populações e indivíduos de *A. crassiflora*.

Palavras-chave: Araticum. Marolo. Citometria de fluxo. Cerrado

### ABSTRACT

Habitat fragmentation has numerous consequences, especially on endemic species. This process favors the reduction of individuals and genetic diversity of a species under these conditions. The species *Annona crassiflora* Mart. can be framed in this context since that its incidence along the Cerrado areas is dwindling, that fact makes valid the identification and characterization of the remaining biodiversity. This work aimed to characterize the nuclear DNA content profile of *in situ* populations of *A. crassiflora* along the Cerrado Mineiro. Populations were georeferenced in the cities of Corinto, Curvelo, Carmo da Mata, Boa Esperança and Paraguaçu. The nuclear DNA content was estimated through flow cytometry using 10 individuals of each population. A significant positive correlation between DNA content and latitude was obtained ( $r = 0.46$ ,  $p = 0.0003$ ). It was concluded that there is variability for the trait DNA content in populations located in different climatic conditions, and that flow cytometry is a useful tool to detect changes in nuclear DNA content among populations and individuals of *A. crassiflora*.

Keyword: Araticum, marolo, flow cytometry, Cerrado

## 1 INTRODUÇÃO

A expansão da fronteira agrícola assim como o estabelecimento urbano resultou em um processo acentuado de degradação do bioma Cerrado. A contínua redução desse habitat tem impacto direto sobre o tamanho das populações de espécies endêmicas desse ecossistema e, por isso, constitui uma ameaça à biodiversidade do Cerrado. O aumento da distância entre populações de uma mesma espécie acarreta o aumento da divergência genética entre elas. Isto ocorre devido à redução do fluxo gênico e redução na variabilidade de pólen disponível. Esse processo tem sérias implicações na sobrevivência das espécies, já que a limitação da variabilidade genética pode suprimir a capacidade de uma determinada população responder a mudanças ambientais que desfavoreçam suas características adaptativas.

A espécie *A. crassiflora* conhecida como marolo, é uma espécie nativa do Cerrado e vem sofrendo redução populacional devido à fragmentação do seu habitat. Atualmente, é possível encontrar essa espécie em pequenas populações ao longo desse bioma. Devido ao seu potencial farmacológico, alimentício, inseticida e alelopático, é de fundamental importância o direcionamento de esforços que contribuam com sua conservação e caracterização da biodiversidade remanescente.

O conteúdo de DNA nuclear das populações remanescentes de *A. crassiflora* ainda encontra-se não relatado. Em muitas espécies existe correlação entre esse parâmetro e caracteres morfológicos, o que pressupõe alterações em sua magnitude em sintonia com processo adaptativo (TEMSCH; GREILHUBER, 2001). A avaliação do conteúdo de DNA em populações localizadas em ambientes distintos pode revelar alterações adaptativas em nível de DNA e ser útil na detecção de variabilidade intraespecífica.

Objetivou-se com este trabalho o georreferenciamento de populações situadas em diferentes mesoregiões de Minas Gerais, visando facilitar futuros trabalhos e verificar a viabilidade do uso da citometria de fluxo como ferramenta de detecção da variabilidade genética entre populações isoladas, utilizando como parâmetro o conteúdo de DNA nuclear.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Populações *in situ* de *A. crassiflora* foram localizadas e identificadas segundo Lorenzi (2002), sendo selecionadas as populações com 10 indivíduos, nos municípios de Boa Esperança, Carmo da Mata, Paraguaçu, Corinto e Curvelo (Figura 1).

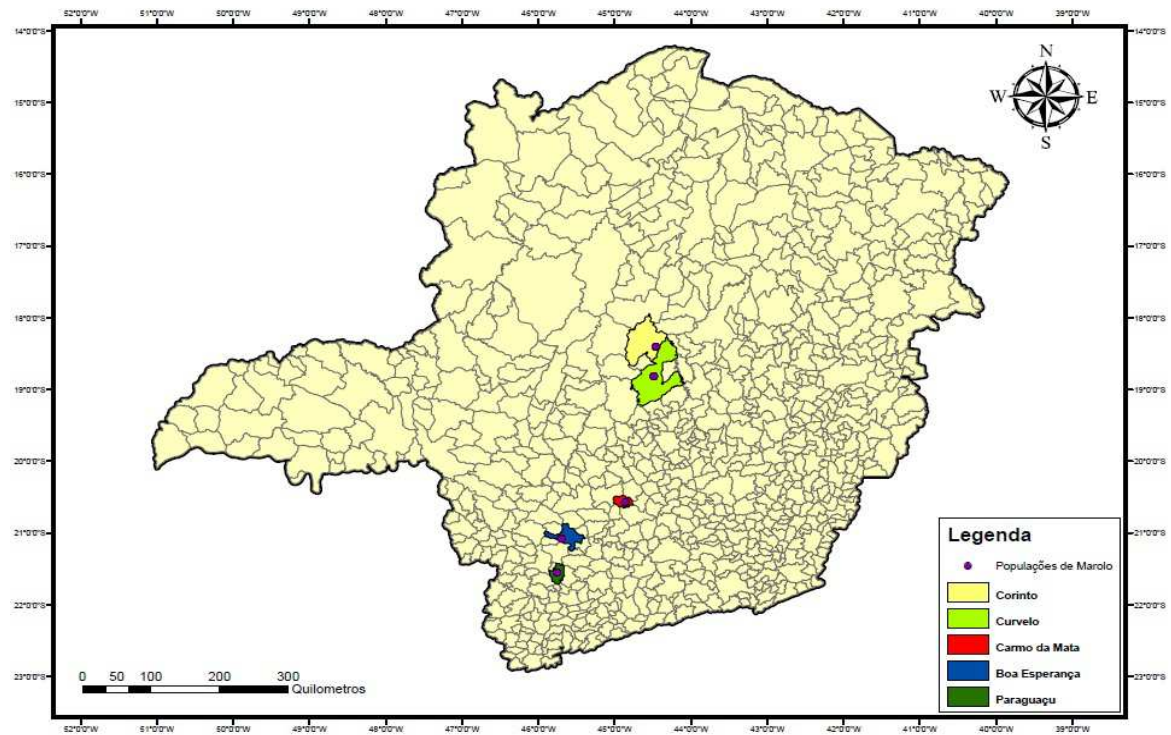


Figura 1 Populações de *Annona crassiflora* Mart. georreferenciadas nos municípios de Corinto, Curvelo, Carmo da Mata, Boa Esperança e Paraguaçu no estado de Minas Gerais

As plantas foram georreferenciadas, em diferentes mesorregiões de Minas Gerais (Tabela 1) com aparelho GPS modelo Vista Hcx GARMIN.

Tabela 1 Coordenadas geográficas das populações de *A. crassiflora* coletadas em Minas Gerais

<b>Local (Município)</b>	<b>Latitude (sul)</b>	<b>Longitude (oeste)</b>	<b>Altitude (m)</b>	<b>Mesorregião de Minas</b>
Boa Esperança	21° 04' 59''	45° 41' 53''	814	Sul / Sudeste
Paraguaçu	21° 33' 03''	45° 45' 29''	846	Sul / Sudeste
Carmo da Mata	20° 33' 59''	44° 52' 09''	869	Oeste
Curvelo	18° 49' 10''	44° 29' 19''	724	Central
Corinto	18° 24' 02''	44° 27' 44''	674	Central

De cada planta foram coletadas três amostras de folhas jovens, em estágio inicial de desenvolvimento e colocadas em sacos plásticos contendo algodão umedecido e mantidas em caixa de isopor com gelo, visando à manutenção da integridade do material vegetal. Após coletadas, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo, em até 24 horas.

Para a quantificação do conteúdo de DNA, folhas jovens e do padrão de referência foram picadas com bisturi em placa de Petri, com 1,0 mL do tampão de extração de núcleos Marie (MARIE; BROWN, 1993). A solução de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze, para filtragem de partículas grosseiras do tecido, posteriormente filtrada em malha de 50 µm (Millipore) e acondicionada em um tubo de poliestireno. A suspensão nuclear foi corada com 25 µL de solução de iodeto de propídeo. Como padrão interno foi utilizado tomate (*Solanum lycopersicum L*) cujo conteúdo é de 1,96 pg de DNA.

As amostras foram mantidas sob refrigeração, no escuro, e em seguida analisadas em citômetro de fluxo modelo FacsCalibur (Biosciences), onde foi possível a obtenção dos histogramas.

O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a razão entre as intensidades de fluorescência dos núcleos G1 (núcleos que estão



na fase G1 da Interfase) do padrão de referência (*Solanum lycopersicum L.*) e dos núcleos G1 da amostra, multiplicando-se esta razão pela quantidade de DNA do padrão de referência (1,96 pg). Para tal estimativa utilizou-se o software WinMDI 2.8.

De posse dos valores de DNA nuclear realizou-se a análise de variância e teste de médias, assim como a avaliação da distância euclidiana para a construção de dendrograma pelo método de UPGMA. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GENES (CRUZ, 2013).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando citometro de fluxo foram obtidos histogramas de cada amostra (Figura 2), os quais foram utilizados para a estimativa do conteúdo de DNA de cada indivíduo das populações citadas.

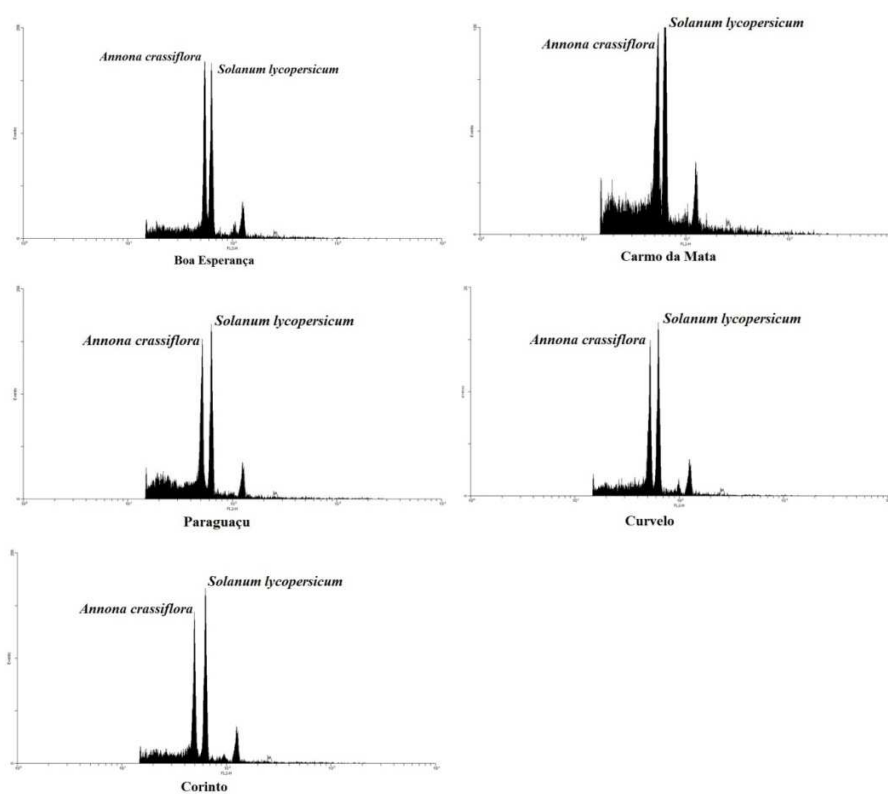


Figura 2 Histogramas representativos das populações de *A. crassiflora* coletadas nos municípios de Boa Esperança, Carmo da Mata, Corinto, Curvelo e Paraguaçu

Todos os picos analisados apresentaram CV (%) abaixo de 1%. Segundo Dolezel e Bartos (2005) valores de CV abaixo de 3% são totalmente aceitáveis e indicam boa precisão na estimativa do conteúdo de DNA.

A análise de variância revelou diferença significativa para o conteúdo de DNA entre populações e entre indivíduos da mesma população (Tabela 2), indicando variabilidade inter e intrapopulacional. Na população de Curvelo os valores variaram de 1,44 a 1,85 pg, sendo a população que apresentou maior amplitude nos valores de conteúdo de DNA, correspondendo à variação de 22% (Tabela 3). A população de Carmo da Mata foi a de menor variação, apresentando valores na faixa de 1,52 a 1,66 pg, que corresponde a 8,4% de variação (Tabela 3).

Tabela 2 Análise de variância do conteúdo de DNA entre e dentro populações de *A. crassiflora*

	GL	Conteúdo de DNA
		QM
Indivíduos	49	0,02116**
Populações	4	0,105676**
Indivíduos/População	45	0,013647**
Indivíduos/ Boa Esperança	9	0,006741**
Indivíduos/ Carmo da Mata	9	0,004685**
Indivíduos/ Corinto	9	0,012387**
Indivíduos/ Curvelo	9	0,0366**
Indivíduos/ Paraguaçu	9	0,007824**
Resíduo	100	0,001102
CV (%)		2,03

\*\*Valores significativos pelo teste F a 5% de probabilidade

Por meio dos dados apresentados, sugere-se que maiores valores de conteúdo de DNA são mais comumente encontrados entre indivíduos de populações situadas em maiores latitudes, sendo as populações da mesorregião Sul/Sudeste de Minas Gerais as de maior conteúdo de DNA (Tabela 3). As estimativas do conteúdo de DNA nuclear das populações situadas nas

mesorregiões Oeste e Central não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 3). Existe certa relação entre conteúdo de DNA e localização geográfica.

Populações com tamanho de genoma aproximado encontram-se mais próximas geograficamente, com exceção da população de Carmo da Mata que se encontra em região intermediária.

Tabela 3 Conteúdo de DNA em populações de *A. crassiflora* distribuídas em diferentes municípios de Minas Gerais

Local (Município)	Conteúdo de DNA				Tamanho do Genoma (Mbp) <sup>a</sup>	CV (%)	
	Menor Valor (pg)	Maior Valor (pg)	Porcentagem de Variação (%)	Média da População (pg)			
Boa Esperança	1,64	1,80	8,88	1,72	a	1682	0,52
Paraguaçu	1,56	1,74	10,34	1,65	b	1613	0,84
Curvelo	1,44	1,85	22,16	1,60	c	1564	0,56
Carmo da Mata	1,52	1,66	8,43	1,60	c	1564	0,55
Corinto	1,49	1,67	10,77	1,57	c	1535	0,66

<sup>a</sup> Tamanho do Genoma calculado como  $1 \text{ pg} = 978 \text{ Mbp}$  (Dolezel et al., 2003)

Os valores seguidos pela mesma letra na coluna pertencem a um mesmo grupo e não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )

Houve correlação positiva e estatisticamente significativa entre os valores de latitude (sul) e conteúdo de DNA pelo teste t ( $r = 0,46$ ,  $p = 0,0003$ ). Contudo, uma faixa geográfica mais ampla deve ser explorada para o melhor entendimento desse tipo de correlação. A escassez de populações *in situ* dessa espécie constitui um entrave para estudos como este.

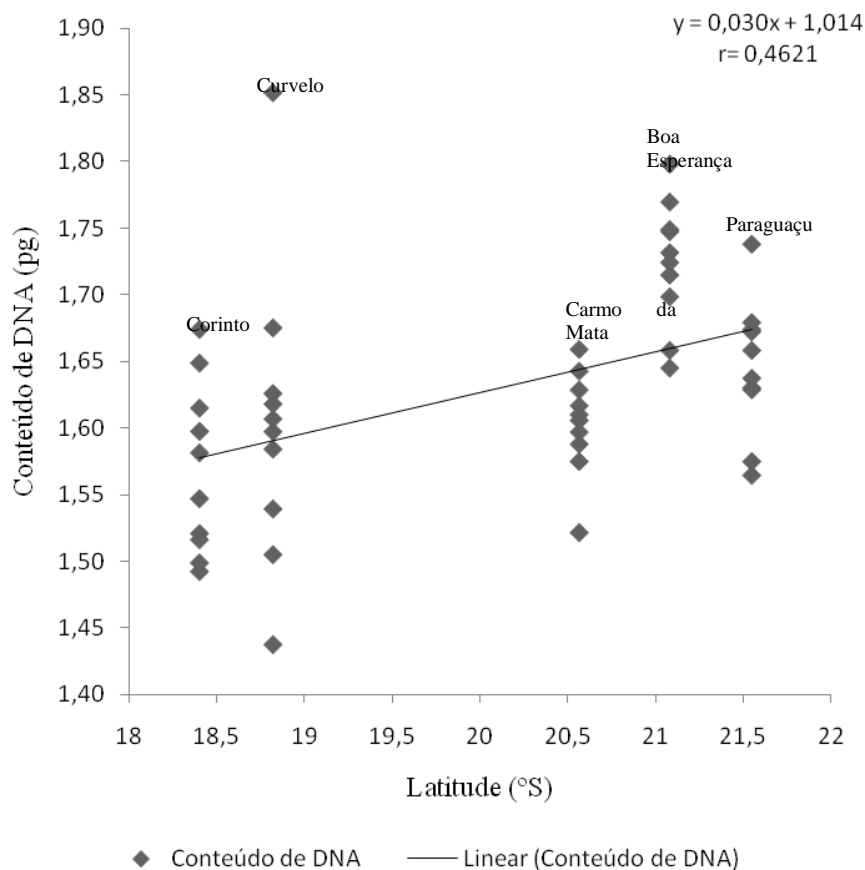


Figura 3 Correlação entre latitude e conteúdo de DNA de plantas de *A. crassiflora* coletadas nos municípios de Corinto, Curvelo, Carmo da Mata, Boa Esperança e Paraguaçu

A variação no conteúdo de DNA em função da variação geográfica é um tema controverso. Correlações tanto positivas quanto negativas e não significativas foram previamente relatadas (LEVIN; FUNDERBURG, 1979; GRIME; MOWFORTH, 1982). Alguns fatores ambientais como temperatura e precipitação, variam de acordo com a latitude e altitude e podem agir como agentes geradores de pressão de seleção promovendo o desenvolvimento de vantagens adaptativas e, portanto, favorecendo alterações no conteúdo de DNA

nuclear. A presença de indivíduos com alto valor de conteúdo de DNA torna-se mais rara especialmente em ambientes de baixa disponibilidade de água e temperaturas extremas (KNIGHT; ACKERLY, 2002). De forma geral, indivíduos com genoma menor podem ser encontrados em habitats com ampla variedade de condições, enquanto genomas maiores aparentemente encontram-se sob condições mais moderadas, estando fora de ambientes extremos (KNIGHT; MOLINARI; PETROV, 2005).

Tavares et al. (2013) detectaram diferenças no tamanho do genoma entre populações de *Eryngium duriaei* situadas em diferentes altitudes. O isolamento de populações em altitudes elevadas favoreceu o desenvolvimento de diferenças morfológicas, de tamanho do genoma e de composição de óleos essenciais. Tensch & Greilhuber (2001) encontraram correlação positiva significativa entre a latitude e o conteúdo de DNA de plantas da espécie *Arachis duranensis*. A correlação com a longitude também foi significativa, porém se deu exclusivamente pela variação da altitude.

Segundo Murray (2005) essa variação é comum entre espécies de diferentes habitats, portanto é possível que em uma mesma espécie também possa ocorrer, principalmente em populações que estão distribuídas em regiões que apresentam pluralidade de condições edafoclimáticas, como é o caso da espécie *A. crassiflora*.

Na Tabela 4 é possível observar algumas características climatológicas regionais dos diferentes locais de coleta, demonstrando as condições mais áridas encontradas na região Central de Minas Gerais, onde foram coletadas as populações de Curvelo e Corinto, condições mais amenas (Sul/Sudeste) onde foram coletadas as populações de Boa Esperança e Paraguaçu, assim como a região Oeste representada pela população de Carmo da Mata com condições intermediárias. Os dados apresentados na Tabela 4 correspondem à média de dados diários coletados de 2000 a 2013.

Tabela 4 Dados climatológicos médios de 2000 a 2013 representativos das regiões Sul/Sudeste, Oeste e Central de Minas Gerais (INMET: Instituto Nacional de Meteorologia, 2013)

Mesorregião	Precipitação (mm/ano)	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Umidade relativa (%)
Sul/Sudeste	1294	27,54	15,54	70,62
Oeste	1300	29,02	15,61	66,14
Central	1008	30,70	17,04	64,98

Devido à heterogeneidade de ambientes e variabilidade intrapopulacional, foi calculada a distância Euclidiana média para quantificação da diversidade, por meio de medidas de dissimilaridade, utilizando o método de agrupamento hierárquico UPGMA para a construção do dendrograma (Figura 4). O objetivo dessa análise foi avaliar o agrupamento entre indivíduos de populações geograficamente mais próximas, levantando a hipótese que indivíduos de mesma população e de populações geograficamente menos isoladas apresentariam maior semelhança para o caráter conteúdo de DNA.

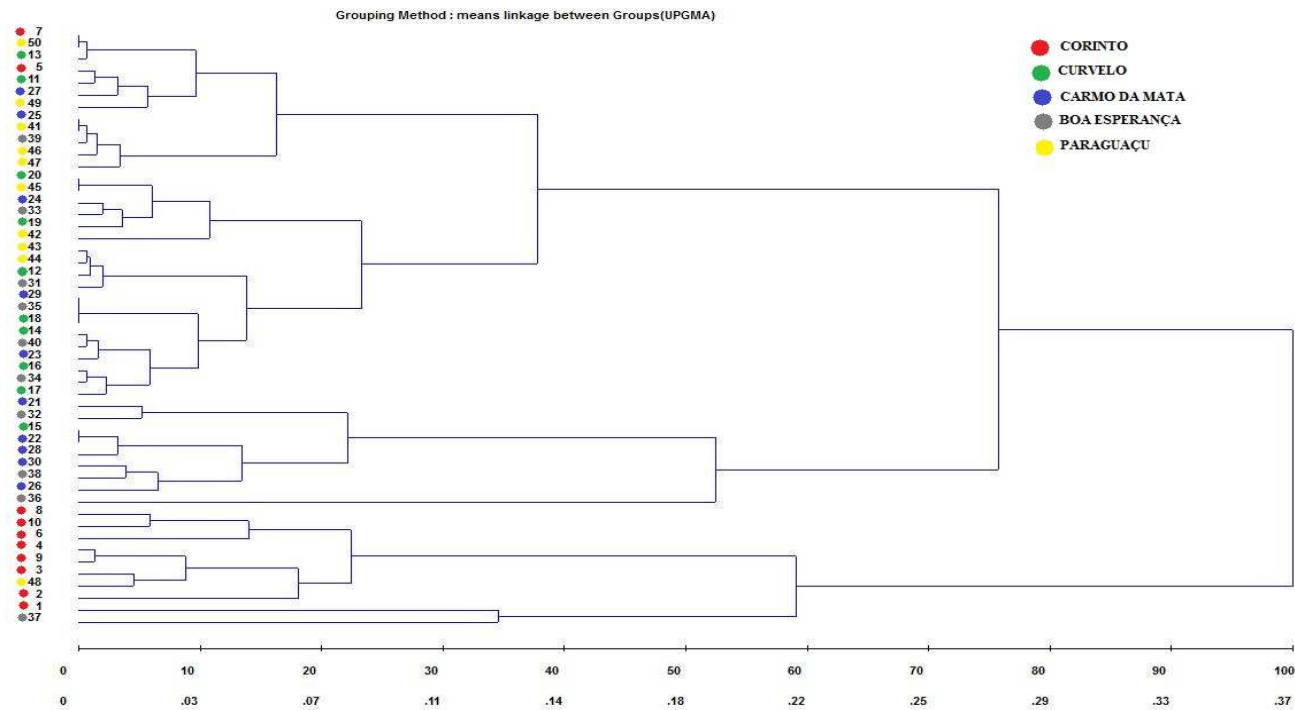


Figura 4 Análise de agrupamento do conteúdo de DNA nuclear individual entre plantas de *A. crassiflora* coletadas em Corinto (1 a 10), Curvelo (11 a 20), Carmo da Mata (21 a 30), Boa Esperança (31 a 40) e Paraguaçu (41 a 50)



Na análise de agrupamento a maior parte dos indivíduos da população de Corinto e Paraguaçu permaneceu agrupada com a maioria dos indivíduos das suas respectivas populações. Os demais indivíduos formaram grupos heterogêneos.

Segundo Telles et al. (2003) visto que a espécie *A. crassiflora* é preferencialmente alógama, sendo uma parcela expressiva da variabilidade genética encontrada entre populações e levando-se em consideração o processo de fragmentação do habitat, temos um cenário de favorecimento da fecundação entre indivíduos aparentados, devido à interrupção do fluxo gênico e variabilidade polínica. Ainda assim, pode-se perceber certo grau de variabilidade dentro das populações, para o caráter conteúdo de DNA.

A diversidade de tamanhos do genoma em uma mesma espécie está relacionada com a capacidade adaptativa específica da espécie, não sendo uma constante passível de generalização. Li et al. (2013), não encontrou diferença intra-específicas ao analisar o conteúdo de DNA nuclear de 36 populações de *Miscanthus*, coletadas em locais de diferentes condições de temperatura e altitude. Neste caso as variações ambientais não promoveram alterações adaptativas que pudessem ter sido detectadas através da avaliação desse caráter.

Em nível adequado, a variabilidade genética remanescente de um germoplasma *in situ*, permite em longo prazo, a resposta da espécie às pressões de seleção. Tal processo acarreta no desenvolvimento de vantagens adaptativas (LOWE et al., 2005). A perda dessa capacidade é um indício de uma crítica redução da variabilidade genética natural existente (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996). Apesar dos ambientes utilizados neste trabalho não apresentarem variação extrema para temperatura, precipitação e umidade, foi detectado certo grau de variabilidade para o caráter conteúdo de DNA, o que nos sugere que esforços direcionados à coleta, conservação e exploração desses recursos genéticos devem ser fomentados.

#### 4 CONCLUSÃO

Existe variabilidade no tamanho do genoma tanto para indivíduos de mesma localização geográfica, quanto entre populações de *A. crassiflora*.

Há correlação positiva significativa entre latitude e conteúdo de DNA nuclear em populações de *A. crassiflora*. Populações mais ao Norte de Minas Gerais apresentaram menor tamanho de genoma.

## REFERÊNCIAS

- CRUZ, C.D. **Programa Genes: Biometria**. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p. 2013.
- DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 99-110, 2005.
- GRIME, J.; MOWFORTH, M. Variation in genome size—an ecological interpretation. 1982. p. 151-153
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA: [www.inmet.gov.br](http://www.inmet.gov.br), 2013.
- KNIGHT, C. A.; ACKERLY, D. D. Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis. **Ecology Letters**, v. 5, n. 1, p. 66-76, 2002.
- KNIGHT, C. A.; MOLINARI, N. A.; PETROV, D. A. The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 177-190, 2005.
- LEVIN, D.; FUNDERBURG, S. Genome size in angiosperms: temperate versus tropical species. **American Naturalist**, p. 784-795, 1979.
- LI, X.; HU, D.; LUO, M.; ZHU, M.; LI, X.; LUO, F.; LI, J.; YAN, J. Nuclear DNA content variation of three *Miscanthus* species in China. **Genes & Genomics**, v. 35, n. 1, p. 13-20, 2013.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol. 1. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, p. 368, 2002.
- LOWE, A.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C. F. E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, v. 95, n. 4, p. 255-273, 2005.
- MARIE, D.; BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, v. 78, n. 1-2, p. 41-51, 1993.
- MURRAY, B. When does intraspecific C-value variation become taxonomically significant? **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 119-125, 2005.

TAVARES, A.; LOUREIRO, J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L.; CANHOTO, J.M.; PAIVA, J. Characterization and distinction of two subspecies of *Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss., an Iberian endemic Apiaceae, using flow cytometry and essential oils composition. **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, n. 3, p. 611-618, 2013.

TELLES, M. P.; VALVA, F. D.; BANDEIRA, L. F.; COELHO, A. S. G. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.-Annonaceae) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

TEMSCH, E. M.; GREILHUBER, J. Genome size in *Arachis duranensis*: a critical study. **Genome**, v. 44, n. 5, p. 826-830, 2001.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 10, p. 413-418, 1996.