

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DE *Urochloa humidicola* (RENDLE)
MORRONE & ZULOAGA**

RODRIGO BARBOSA BRAGA FEITOZA

**Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF
Campos dos Goytacazes
Dezembro 2019**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DE *Urochloa humidicola*
(RENDLE) MORRONE & ZULOAGA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, área de concentração em Biologia Celular e Tecidual - CBB/UENF, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Aluno: Rodrigo Barbosa Braga Feitoza

Orientadora: Dr^a. Maura Da Cunha

Co-orientadora: Dr^a. Helena Regina Pinto Lima

CAMPOS DOS GOYTACAZES

Dezembro/2019

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DE *Urochloa humidicola*
(RENDLE) MORRONE & ZULOAGA**

RODRIGO BARBOSA BRAGA FEITOZA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, área de concentração em Biologia Celular e Tecidual - CBB/UENF, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 17 de dezembro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA:



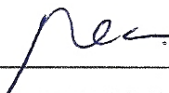
Dr^a. Sarah Christina Caldas Oliveira – UnB



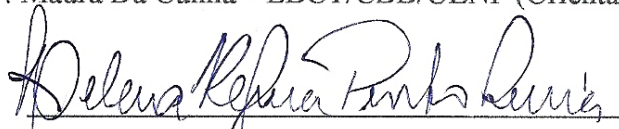
Dr^a. Dulce Gilson Mantuano –UFRJ



Dr^a. Katia Valevski Sales Fernandes – LQFPP/CBB/UENF



Dr^a. Maura Da Cunha – LBCT/CBB/UENF (Orientadora)



Dr^a. Helena Regina Pinto Lima – UFRRJ (Co-orientadora)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual no setor de Biologia Vegetal, associado ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, no Departamento de Botânica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação da Dra. Maura Da Cunha e co-orientação da Dra. Helena Regina Pinto Lima, no Grupo de Alelopatía de Cádiz, da Universidad de Cádiz, Espanha, com financiamento de apoio à pesquisa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e bolsas de Doutorado no País e Doutorado Sanduíche concedidas pelo programa PDSE/CAPES.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente, de uma forma ou de outra, na minha vida, nos tropeços e nas vitórias, por proporcionar a mim e a todas as pessoas à minha volta com bons momentos e boas conquistas.

Às instituições de fomento: à CAPES, pela concessão das bolsas de Doutorado no Brasil e do Doutorado Sanduíche; ao CNPq e à FAPERJ, pelo suporte financeiro; à AGEVAP, pelo auxílio financeiro ao longo dos dois últimos anos.

À Dr^a. Maura Da Cunha, pela paciência, pela prestatividade, pelo “fique tranquilo, está tudo certo”, e sobretudo pelo acolhimento desde quando eu era apenas um recém-graduado, perdido em Campos dos Goytacazes, totalmente fora do ritmo dos “Mauretes”, e ainda descobrindo a Microscopia Eletrônica e as novas possibilidades de trabalho. Hoje eu sei: me sinto em casa na Sala 25, anexo CBB.

À Dr^a. Helena Regina Pinto Lima, que tem estado comigo desde que me iniciei na Anatomia Vegetal. À parceria que está para completar 10 anos (e contando). À cumplicidade, às suas ideias que surgiam durante os cafés, e principalmente aos pequenos e grandes ensinamentos que eu custava compreender, mas que carregou para sempre comigo, na minha formação profissional e na pessoal.

Ao Dr. Francisco Antonio Macías e à Dra. Rosa María Varela, da Universidad de Cádiz, por toda a assistência durante o Doutorado Sanduíche. Apesar das iniciais barreiras linguística, cultural, e do meu primeiro contato com a química de bancada, não foi difícil me aclimatar ao ritmo de trabalho sob a supervisão dessas pessoas extraordinárias. ¡Hasta pronto!

Ao Coordenador de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, Arnoldo Façanha, e às secretarias, Beatriz e Marlene, pelo suporte acadêmico e burocrático ao longo do meu doutoramento. Ao corpo técnico do LBCT, especialmente Giovanna Alves e Beatriz Ferreira, pelo suporte acadêmico e burocrático ao longo do meu doutoramento.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo auxílio na realização das análises em microscopia óptica.

À Embrapa Agrobiologia, por todo o auxílio logístico e técnico durante os bioensaios com os solos de pastagem, especialmente ao Dr. Luiz Fernando Duarte de Moraes, pela enorme colaboração nesse estágio da Tese, e pelas valorosas discussões sobre o trabalho. Agradeço também ao graduando Renato Fernandes Jr. por todo o suporte na montagem dos bioensaios e nas avaliações pós-ensaio.

Ao Dr. Heitor Monteiro Duarte, e a toda equipe do NUPEM/UFRJ de Macaé, pela ilustre colaboração nas análises fotossintéticas, pelo auxílio nas análises estatísticas, e por todo o suporte logístico.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite da referida defesa, e pelas oportunas contribuições ao trabalho.

Aos “Mauretes da Ostentação”, quer dizer, aos colegas do laboratório SBV/UENF: Camilla Ribeiro, Dhiego Oliveira, Fernanda Trindade, Gabriel Amaral, Glazielle Campbell, Guilherme Rabelo, Isabel Moreno (*in memoriam*), Marcos José, Neilor Borges, Priscila Simioni, Saulo Pireda, Warlen Costa e muitos outros, não só por me auxiliarem em tudo que necessitava, mas por proporcionarem uma caminhada mais leve desde meu mestrado.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica da UFRRJ: aos demais professores Luiz Ricardo, Joelcido Rocha e Rafael Pimentel, e aos colegas Cláudia Souza, Fernanda Elis, Kathlyn Gevú, João Kléber Fernandes, Natália Baptista, Sabrina Pereira e aos demais. Vocês já fazem parte da minha vida.

Ao Departamento de Química Orgânica da Universidad de Cádiz: aos professores Ana Simonet, Ascensión Torres (“Chon”), José Molinillo (“Chema”), e aos colegas Carlos, David, Javi, Jesús, Maité, Sandra e todos aqueles com quem tive menos contato. Sou obrigado a concordar com Rosa: seis meses foi muito pouco. Já quero voltar.

Ao Ubiraci (Bira), que é mais que um pai, é meu melhor amigo! É o melhor exemplo de homem que conheço, e foi o primeiro a me inspirar a trilhar o caminho da Biologia. Ao meu irmão Luís Felipe, mesmo distante, “no meio do tal de Kansas”, compartilhando comigo experiências de vida e de academia. Por fim, a todos os Feitozas (com “z” ou com “s”), que sempre foram a minha base.

RESUMO

Urochloa humidicola (Rendle) Morrone & Zuloaga (Poaceae) foi introduzida no Brasil como forrageira, e desde então tem afetado negativamente ecossistemas nativos por conta do seu potencial invasor. Estudos prévios sugerem que o efeito alelopático de seus metabólitos especiais pode justificar a dominância dessa espécie em ambientes invadidos. Este trabalho teve como objetivos (i) avaliar o potencial fitotóxico das raízes de *U. humidicola* sobre distintas espécies-alvo, incluindo espécies arbóreas nativas; (ii) isolar e identificar potenciais substâncias fitotóxicas a partir dos seus extratos radiculares; e (iii) avaliar os mecanismos de ação dessas substâncias nos níveis estrutural, ultraestrutural e fisiológico. As coletas dos substratos das pastagens e das raízes de *U. humidicola* foram realizadas no Setor de Caprinocultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. O substrato coletado de áreas com monodominância de *U. humidicola*, com ou sem adição de carvão ativado, foi distribuído em bandejas e recebeu indivíduos pré-germinados de gergelim e de *Anadenanthera colubrina*, espécie nativa da Mata Atlântica. O estabelecimento de indivíduos de *U. humidicola* pré-germinados também foi testado sobre os componentes do substrato com crescimento anterior das espécies nativas *A. colubrina* e *Guarea guidonia*. As raízes de *U. humidicola* foram secas, trituradas, e seus extratos foram testados quanto à fitotoxidez. O extrato mais promissor foi submetido a isolamento biodirigido das substâncias majoritárias. Análises anatômicas e ultraestruturais com raízes de *A. colubrina* tratadas com o extrato seguiram metodologias usuais para microscopia óptica e eletrônica de transmissão. Foram conduzidas análises de pH rizosférico e de fluorescência da clorofila nos indivíduos de gergelim após tratamento com o mesmo extrato. O solo de pastagem inibiu o desenvolvimento inicial do gergelim, enquanto o solo das nativas estimulou o crescimento de *U. humidicola*, indicando potencial fitotóxico da gramínea no ambiente natural. Dentre os extratos das raízes, o obtido com acetato de etila (RAE) apresentou maior fitotoxidez, inibindo germinação e crescimento longitudinal de diferentes espécies-alvo. O extrato RAE causou alterações na estrutura anatômica, como início de formação de estrutura secundária de raiz e maior diferenciação de fibras, e causou degradação de organelas membranares e da cromatina nuclear, nas células das raízes de *A. colubrina*. Esse mesmo extrato inibiu a acidificação da rizosfera, e diminuiu a eficiência quântica do fotossistema II. Sete substâncias majoritárias foram identificadas, sendo cinco inéditas na literatura: o diterpenoide, brachialactol, e quatro saponinas, as humidicinas A-D. A característica das saponinas de interagirem com as membranas celulares pode justificar os efeitos estruturais,

ultraestruturais e fisiológicos observados. O demonstrado efeito fitotóxico de *U. humidicola* sugere a necessidade de manejo adequado das áreas invadidas por essa espécie exótica, e indica seu potencial uso para controle de plantas daninhas, dentro do contexto da agricultura sustentável.

Palavras-chave: alelopatia, angico, brachialactol, *Brachiaria*, fotossistema II, Microscopia Eletrônica de Transmissão, saponinas esteroídicas.

ABSTRACT

Urochloa humidicola (Rendle) Morrone & Zuloaga (Poaceae) was introduced in Brazil as a forage species, and it has been negatively affecting native ecosystems since then, due to its invasive potential. Earlier studies suggest the allelopathic effect of its special metabolites may justify the dominance in invaded areas. This work aimed (i) to evaluate the phytotoxicity of *U. humidicola* roots on distinct target species, including native wood species; (ii) to isolate and identify potential phytotoxic compounds from their root extracts, and (iii) to evaluate the mode of action of these compounds at the structural, ultrastructural and physiological levels. Both *U. humidicola* pasture substrate and roots were collected at the Goat Sector in the UFRRJ, Seropédica, RJ. The substrate from areas with monodominant *U. humidicola*, with or without activated charcoal, was disposed into trays and received individuals of sesame and the Atlantic Forest-native *Anadenanthera colubrina*. The establishment of *U. humidicola* was also tested on substrate components after cultivation with the native species *A. colubrina* and *Guarea Guidonia*. Roots of *U. humidicola* were dried, grounded, and their extracts were tested for phytotoxicity. The most promising extract was submitted to a bioguided isolation of their major compounds. Anatomical and ultrastructural analysis with *A. colubrina* roots treated with *U. humidicola* extract were conducted according to usual light and transmission electron microscopy techniques. Analysis of rhizospheric pH and chlorophyll fluorescence were also conducted after treatment with the same extract. The pasture soil hampered sesame initial development, whereas the soil from native species enhanced *U. humidicola* growth, indicating grass phytotoxicity in the natural environment. The ethyl acetate extract (REA) exhibited the highest phytotoxicity among all root extracts, as it inhibited germination and longitudinal growth of distinct target species. REA caused changes in anatomical structure, such as initiation of root secondary structure and fiber differentiation, and damaged cell membrane organelles and nucleus chromatin in *A. colubrina* roots. The same extract inhibited rhizosphere acidification, and lowered the quantum efficiency of photosystem II. Seven major compounds were identified, including five novel compounds: the diterpenoid brachialactol, and four novel saponins, humidicine A-D. The ability of saponins to interact with cell membranes may justify the observed structural, ultrastructural and physiological effects. The demonstrated phytotoxicity of *U. humidicola* highlights the need of a proper management of *U. humidicola* invaded areas, and point to its potential use in weed control, in the context of sustainable agriculture.

Keywords: allelopathy, angico, *Brachiaria*, brachialactol, photosystem II, Transmission Electron Microscopy, steroidal saponins.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de metabólitos especiais que podem atuar como aleloquímicos	9
Figura 2: <i>Urochloa humidicola</i> (capim-braquiária).	18

CAPÍTULO 1

Figura 1. Indivíduos de gergelim após 35 dias de experimento.	28
Figura 2. Efeito do substrato de pastagens de <i>Urochloa humidicola</i> sobre o desenvolvimento inicial do gergelim (n=32).	28
Figura 3. Indivíduos de <i>Anadenanthera colubrina</i> após 35 dias de experimento.	29
Figura 4. Efeito do substrato de pastagens de <i>Urochloa humidicola</i> sobre o desenvolvimento inicial de <i>Anadenanthera colubrina</i> após 35 dias de experimento (n=32).	29
Figura 5. Indivíduos de <i>Urochloa humidicola</i> após 35 dias de experimento.	30
Figura 6. Efeito do substrato obtido de mudas de espécies nativas <i>Anadenanthera colubrina</i> e <i>Guarea guidonia</i> sobre o desenvolvimento inicial de <i>Urochloa humidicola</i> (n=32).	31

CAPÍTULO 2

Figure 1. Effect of distinct extracts of <i>Urochloa humidicola</i> root on wheat coleoptile length (n=5, r=3).	51
Figure 2. Effect of ethyl acetate extract (REA) of <i>Urochloa humidicola</i> roots on seed germination, root length and shoot length of Standard Target Species (STS).	53
Figure 3. Effect of ethyl acetate extract (REA) of <i>Urochloa humidicola</i> roots on seed germination, root length and shoot length of weed species.	54
Figure 4. Effect of ethyl acetate extract (REA) of <i>Urochloa humidicola</i> roots on seed germination, root length and shoot length of <i>Anadenanthera colubrina</i>	55
Figure 5. Cross section of <i>Anadenanthera colubrina</i> , 0.5 cm from root tip.	57
Figure 6. <i>Anadenanthera colubrina</i> root cells, 0.5 cm from root tip, as observed in Transmission Electron Microscopy (TEM).	58
Figure 7. Effect of distinct fractions of ethyl acetate extract (REA) of <i>Urochloa humidicola</i> roots on wheat coleoptile length (n=5, r=3).	59
Figure 8. Isolated and characterized compounds from <i>Urochloa humidicola</i> roots.	60

Figure 9. A) Key HMBC (arrows H→C) and ¹ H- ¹ H-COSY correlations for compound 1	61
Table 2. ¹ H NMR and ¹³ C Spectroscopic Data for compound 1 (CH ₃ CD) ^{a,c}	61
Figure 10. Key HMBC (red arrows H→C) and ¹ H- ¹ H-COSY (blue lines) correlations for 4 and 5	63
Figure 11. Key HMBC (red arrows H→C) correlations between sugar and aglycone for 6 and 7	65

CAPÍTULO 3

Figura 1: Efeito do extrato acetato de etila de raízes de <i>Urochloa humidicola</i> (RAE) sobre o comprimento radicular, caulinar e total de indivíduos de gergelim (n=24).	81
Figura 2. Avaliação do pH rizosférico de indivíduos de gergelim após tratamento com o extrato acetato de etila de raízes de <i>Urochloa humidicola</i> (RAE), na concentração de 1000 ppm.	81
Figura 3: Valores da eficiência quântica potencial do FSII (<i>F_v/F_m</i>) de cotilédones de gergelim tratados com o extrato acetato de etila de raízes de <i>Urochloa humidicola</i> (n=24).	82
Figura 4: Efeito da concentração do extrato de raízes de <i>Urochloa humidicola</i> em acetato de etila sobre o curso diurno da eficiência quântica efetiva do FSII (\square_{FSII}) em cotilédones de gergelim durante dois dias de medição.	83
Figura 5: Efeito da concentração do extrato de raízes de <i>Urochloa humidicola</i> em acetato de etila sobre a eficiência quântica efetiva do FSII (\square_{FSII}) em cotilédones de gergelim após 4 horas de exposição à luz.	84
Figura 6. Efeito do tratamento com o extrato acetato de etila de raízes de <i>Urochloa humidicola</i> (RAE) sobre parâmetros fotossintéticos de curvas rápidas de resposta à luz de cotilédones de gergelim.	85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Propostas de classificação dos metabólitos especiais.	9
---	---

CAPÍTULO 2

Table 1. IC ₅₀ and r ² values for each <i>Urochloa humidicola</i> root extract and fraction, after wheat coleoptile bioassay (p = 0,05).....	51
Table 2. ¹ H NMR and ¹³ C Spectroscopic Data for compound 1 (CH ₃ CD) ^{a,c}	61
Table 3. ¹ H NMR and ¹³ C Spectroscopic Data for the Aglycone Moieties of Compounds 4 -7 (MeOD) ^c	66
Table 4. ¹ H NMR and ¹³ C Spectroscopic Data of the Sugar Portions of Compounds 4 -7 (MeOD) ^c	67

LISTA DE ABREVIATURAS

α – taxa fotossintética limitada pela luz

δ_C – deslocamento químico de carbono

δ_H – deslocamento químico de hidrogênio

λ – comprimento de onda

Φ_{PSII} – eficiência quântica efetiva do fotossistema II

ATP – adenosina trifosfato

BOD – *Biochemical Oxygen Demand* – Demanda Bioquímica de Oxigênio

BNI – *Biological Nitrification Inhibition* – inibição da nitrificação biológica

CaSO₄ – sulfato de cálcio

CHCl₃ – clorofórmio

COSY – *Correlation spectroscopy* – Espectroscopia de correlação

dH₂O – água destilada

DMSO – dimetilsulfóxido

E_k – irradiância mínima de saturação

ETR – taxa de transporte de elétrons

ETR_m – taxa máxima de transporte de elétrons

FABMS – *Fast Atom Bombardment Mass Spectroscopy* - espectrometria de massa por bombardeamento atômico rápido

FT-IR – *Fourier transformed infrared* – espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

F – fluorescência da clorofila a momentânea, com iluminação constante

F_0 – fluorescência da clorofila a mínima, após aclimatação ao escuro

F_m – fluorescência da clorofila a máxima, após aclimatação ao escuro

F_m' – fluorescência da clorofila a máxima, após iluminação constante

F_v – fluorescência variável da clorofila a , após aclimatação ao escuro.

F_v/F_m – eficiência quântica potencial do fotossistema II

H⁺-ATPase – Adenosina trifosfato fosfohidrolase

HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

HREITOFMS – *High Resolution Electrospray Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*

HMBC – *Heteronuclear multiple-bond correlation*
HSQC – *Heteronuclear single-quantum coherence*
 $i\Phi_{\text{PSII}}$ – eficiência quântica efetiva do fotossistema II, calculada por deconvolução de imagens
IC₅₀ – concentração de inibição em 50%
 iF – imagem da fluorescência momentânea
 iFm – imagem da fluorescência máxima
IR – *infrared* – infravermelho
KBr – brometo de potássio
MeOD - metanol deuterado
MeOH – metanol
mini-PAM – *Mini Pulse-Amplitude-Modulated fluorometer* – fluorímetro portátil de modulação de amplitude de pulso
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NMR – *Nuclear Magnetic Resonance* - Ressonância Magnética Nuclear
NWH – *Novel Weapon Hypothesis* – Hipótese da Arma Nova
OM – *Optical Microscopy* – Microscopia Óptica
OsO₄ – tetróxido de ósmio
PPFD – *Photosynthetic Photon Flux Density* - densidade de fluxo de fóton fotossintético
ppm – partes por milhão
PSII – fotossistema II
RAc – extrato acetona de raízes de *Urochloa humidicola*
RCA – *root crude extract* - extrato bruto aquoso de raízes de *Urochloa humidicola*
RAE ou REA – fração acetato de etila de raízes de *Urochloa humidicola*
RAF – *root aqueous fraction* - fração aquosa de raízes de *Urochloa humidicola*
RFA – radiação fotossinteticamente ativa
RMe – extrato metanólico de raízes de *Urochloa humidicola*
RMS – extrato metanólico sequenciado de raízes de *Urochloa humidicola*
ROESY – *Rotating-frame Overhauser Spectroscopy*
RP-18 – *Reversed-phase 18 column* – coluna cromatográfica de fase reversa
STS – *Standard Target Species* – espécies-alvo padrões
TEM – *Transmission Electron Microscopy* – Microscopia Eletrônica de Transmissão
TLC – *Thin-Layer Chromatography* – cromatografia de camada delgada
TOCSY – *Total Correlation Spectroscopy*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
2.1. Alelopatia e Fitotoxidez	3
2.2. <i>A Novel Weapon Hypothesis e Homeland Security</i>	5
2.3. Metabolismo Especial na Alelopatia	8
2.3.1. <i>Diversidade química dos metabólitos especiais</i>	8
2.3.2. <i>Interações bióticas e abióticas na disponibilidade dos aleloquímicos</i>	11
2.4. Efeitos dos aleloquímicos sobre as plantas-alvo	12
2.4.1. <i>Germinação e desenvolvimento inicial</i>	12
2.4.2. <i>Anatomia e ultraestrutura das plantas-alvo</i>	13
2.4.3. <i>Fotossíntese e outros processos fisiológicos</i>	15
2.5. <i>Urochloa humidicola</i> (Rendle) Morrone & Zuloaga.....	16
3. OBJETIVOS	21

CAPÍTULO 1

22

Avaliação do efeito de aleloquímicos ocorrentes em substratos oriundos de pastagens de *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga ou cultivados com espécies nativas da Mata Atlântica.....

22

Resumo	23
Introdução	24
Material e Métodos.....	26
<i>Coleta dos substratos</i>	26
<i>Ensaio em casa de vegetação</i>	26
Resultados	27
Discussão	31
Referências Bibliográficas	34

CAPÍTULO 2

40

Evaluation of phytotoxicity of *Urochloa humidicola* roots by bioassays and microscopic analysis. Characterization of new compounds

40

Abstract.....	41
Introduction.....	42
Material and Methods.....	44
Results and Discussion	50
References.....	67

CAPÍTULO 3	73
Avaliações fisiológicas do potencial fitotóxico do extrato de raízes de <i>Urochloa humidicola</i> (Rendle.) Morrone & Zuloaga sobre o desenvolvimento de plântulas de gergelim	73
Resumo	74
Introdução	75
Materiais e Métodos	77
Resultados	80
Discussão	85
Referências Bibliográficas	89
4. DISCUSSÃO GERAL.....	97
5. CONCLUSÕES GERAIS	101
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

1. INTRODUÇÃO GERAL

A partir dos anos 1960, com o intuito de suprir a demanda energética do gado, estimulou-se a inserção de diferentes espécies de gramíneas forrageiras exóticas para a formação de pastagens, com destaque maior para as espécies do gênero *Urochloa* P. Beauv. (Poaceae). Esse gênero, constituído de cerca de 100 espécies de origem tropical e subtropical, hoje corresponde a 95 Mha das pastagens em território nacional, estando distribuídas no Cerrado e em áreas marginais da Amazônia e Mata Atlântica (PIZARRO *et al.*, 1996; GARCEZ, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Uma das gramíneas introduzidas no país é a espécie *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga (= *Brachiaria humidicola*), conhecida popularmente como capim-humidícola ou quicuío-da-amazônia. Tem como origem o leste africano, e teve sucesso no Brasil pela resistência à cigarrinha das pastagens, alta adaptação a solos pobres e úmidos, além da alta produção forrageira (KICHEL *et al.*, 1999; PERON & EVANGELISTA, 2004; KARIA *et al.*, 2006).

Contudo, as espécies de braquiária que foram introduzidas no Brasil para fins forrageiros passaram a dominar rapidamente sobre as espécies nativas (BAO *et al.*, 2015). O rápido e agressivo crescimento dessas espécies, a maior competitividade fisiológica do mecanismo fotossintético C₄ (RIBEIRO, 2012) e a relativamente alta produção de sementes (DEMINICIS *et al.*, 2010; AJALA-LUCCAS *et al.*, 2018), são fatores frequentemente citados como possíveis justificativas ao alto potencial invasivo de *Urochloa* spp., incluindo *U. humidicola*.

Ademais, o processo de invasão de novos habitats pode ser facilitado por interações químicas entre as plantas invasoras e as locais (CALLAWAY & RIDENOUR, 2004): a Hipótese da Arma Nova (*Novel Weapon Hypothesis – NWH*) propõe que espécies exóticas, ao produzir e liberar ao ambiente uma gama de metabólitos especiais, podem levar vantagem sobre espécies nativas que, sem “contato” prévio com tais moléculas, têm seu estabelecimento afetado negativamente. Esse processo é definido como alelopatia (IAS, 1996). A melhor compreensão desse processo demanda esforço multidisciplinar, e possibilita maior entendimento dos padrões de invasão de espécies vegetais exóticas para fins de manejo de populações nativas (GRUNTMAN *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2017).

Até o presente momento, a maioria dos pesquisadores que avaliaram o potencial alelopático das diferentes espécies de *Urochloa* conduziram seus estudos com a parte

aérea dessas gramíneas, seja realizando bioensaios com extratos ou identificando possíveis aleloquímicos (SOUZA FILHO *et al.*, 1997, 2005; KATO-NOGUCHI *et al.*, 2014; NEPOMUCENO *et al.*, 2017). Esses estudos desconsideram a raiz como um importante órgão vegetal de produção de metabólitos no gênero *Urochloa*. Até o presente momento, foram isoladas e identificadas diferentes classes de metabólitos nas raízes dessas espécies, incluindo substâncias fenólicas, saponinas e diterpenoides, que podem ser produzidas, armazenadas e liberadas ao ambiente (SUBBARAO *et al.*, 2009; DA SILVA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A espécie *U. humidicola* é conhecida por ter alta emissão de raízes adventícias, as quais formam uma rede extensa no solo (BRASIL, 2001; BAO *et al.*, 2015), indicando um órgão promissor na prospecção de produtos naturais, incluindo substâncias que atuam como inibidoras da nitrificação biológica no solo (GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2007; SUBBARAO *et al.*, 2008). Os estudos, realizados até a presente data, revelam a necessidade de avaliar, de forma mais assertiva: 1) a composição fitoquímica de suas raízes; 2) a interferência dessas raízes no desenvolvimento de outras espécies vegetais; e 3) os mecanismos de ação dessas substâncias nas plantas-alvo. Responder a estes três tópicos pode indicar se o potencial fitotóxico *U. humidicola* corrobora a Hipótese da Arma Nova, ao facilitar sua introdução em um novo ambiente, e posteriormente, no processo invasivo.

Esta tese está organizada em três capítulos, os quais estão apresentados na forma de artigos. O Capítulo 1 apresenta os resultados relativos à atividade fitotóxica do solo de pastagens de *U. humidicola* sobre diferentes espécies-alvo, incluindo a espécie arbórea nativa da Mata Atlântica, *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan. O Capítulo 2 se trata da avaliação de fitotoxidez de extratos de raízes de *U. humidicola*, seguida de isolamento biodirigido de suas substâncias majoritárias. Esses dados foram submetidos ao periódico *Journal of Agricultural and Food Chemistry* em outubro de 2019 sob o título “Evaluation of phytotoxicity of *Urochloa humidicola* roots by bioassays and microscopic analysis. Characterization of new compounds”. O Capítulo 3 apresenta avaliações da fisiologia das raízes e eficiência fotoquímica do gergelim após tratamento com o extrato das raízes de *U. humidicola*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Alelopatia e Fitotoxidez

Com o advento e o aperfeiçoamento das técnicas de agricultura, não é de se admirar que os primeiros relatos de uma planta interferindo no crescimento de outra tenham surgido a partir da ação humana no cultivo agrário, sendo manifestados independentemente em diferentes partes do globo terrestre (RIZVI *et al.*, 1992).

Os primeiros relatos datam de 500 a.C., na Índia. Nessa época, Varahamihara (*apud* WILLIS, 2007) sugeriu que indivíduos de gergelim (*Sesamum indicum* L.), ao serem picados e incorporados ao solo, poderiam auxiliar no controle de ervas daninhas. Posteriormente, Surapala (*apud* WILLIS, 2007) teria recomendado que qualquer plantio deva ser realizado em locais distantes de indivíduos de gergelim e feijão-negro (*Vigna mungo* L.). Na China, escritos datados a partir de 250 a.C. mencionam desde a secreção de “sucos maléficos” como ação de uma espécie de videira sobre espécies arbóreas, até diferentes combinações de consórcio entre culturas distintas, sejam elas benéficas ou maléficas (CHOU, 2006). Outros relatos independentes foram registrados na cultura árabe (século IX d.C.) e no Japão (século XVII) (RIZVI *et al.*, 1992; WILLIS, 2007).

Os relatos mais conhecidos e difundidos no Ocidente foram provenientes da Grécia Antiga. Teofrasto (300 a.C.), hoje conhecido como o “pai da Botânica”, em seu livro *Historia Plantarum*, observou que o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) causava o esgotamento do solo e tinha efeito fitotóxico sobre plantas invasoras. Segundo o mesmo autor, o sentido do crescimento caulinar da videira pode ser alterado quando em contato com outras plantas aromáticas. Suas obras não citaram somente possíveis interações negativas entre plantas, como também mencionaram associações benéficas entre duas culturas vegetais, como plantas que protegem outras do ataque de herbívoros e patógenos. As observações de Teofrasto foram posteriormente corroboradas por outros filósofos gregos como Ateneu, Demócrito e Dioscórides (RIZVI *et al.*, 1992; REIGOSA *et al.*, 2013).

Muitos outros exemplos de tais interações na agricultura apareceram posteriormente na Roma Antiga. Marco Varrão (149 a.C.) utilizava o conceito de “antipatia” para plantas que não se estabeleciam bem junto de outras. Virgílio (29 a.C.) defendia o uso da rotação de culturas, visto que o solo poderia ser “esgotado” após cultivo excessivo de determinadas plantações. Por sua vez, Plínio (79 d.C.) retomou os relatos de Teofrasto e, em meio a muitos outros relatos de “antipatia” entre plantas, observou que o

grão-de-bico e a cevada (*Hordeum vulgare* L.) afetavam plantações de milho (*Zea mays* L.) (SINGH *et al.*, 2001; LATIF *et al.*, 2017).

A partir do séc. XVIII, em um momento quando era frequente utilizar termos da biologia animal no estudo de plantas, emergiram diferentes estudos sobre “excreção radicular” como tentativas na elucidação de mecanismos de liberação de diferentes substâncias, até então tratadas como “resto metabólico”. Essa linha de investigação serviu de base para os estudos em alelopatia que viriam nos anos seguintes ao relacionar a liberação dessas substâncias com o esgotamento do solo causado pela planta produtora (WILLIS, 2007). Estudos esses que seguiram com De Candolle (*apud* SINGH *et al.*, 2001), que propunha a teoria da rotação de culturas para superar a questão do esgotamento do solo, e adicionava à equação da “excreção radicular” a liberação de metabólitos por meio da decomposição de partes da planta.

A alelopatia como linha de pesquisa voltou a ganhar força já no séc. XX, com o advento de novas áreas de investigação como microbiologia do solo, química ecológica e ecologia da conservação, além do interesse crescente na química dos metabólitos especiais. Nesse sentido, as obras de autores como Molisch (1937) e Madaus (1937) se tornaram divisores de águas ao fincar as bases do conceito moderno de alelopatia. O primeiro cunhou o termo alelopatia (do grego *allelon* = de um para outros, e *pathós* = sofrer), ao observar o efeito negativo de substâncias voláteis sobre outras plantas. A obra de Madaus é mais abrangente e inclui informações sobre exsudatos radiculares como inibidores ou estimuladores do crescimento de determinadas plantas, além de outros com substâncias voláteis, incluindo óleos essenciais (MADAUS, 1937; BÄSSLER, 1938).

Atualmente, a alelopatia é definida como a interação caracterizada pela atividade de metabólitos especiais que são liberados ao ambiente natural a partir do organismo que os produzem (algas, fungos, bactérias ou plantas), a qual afeta, positiva ou negativamente, o desenvolvimento de indivíduos de outras espécies ou da própria espécie (RICE, 1984; IAS, 1996). Para um estudo ser considerado alelopático, os bioensaios devem ser conduzidos nas condições mais próximas ao natural, ou ao menos devem imitar os processos que liberariam os aleloquímicos no ambiente (FERREIRA & ÁQUILA, 2000; REIGOSA *et al.*, 2013). Os bioensaios que adotam solventes orgânicos não naturais, como hexano, diclorometano e metanol, na obtenção dos extratos, não podem ser considerados estudos alelopáticos, sendo denominados estudos fitotóxicos. Além disso, os ensaios em laboratório têm outra limitação; essa abordagem desconsidera uma gama de interações, tanto fisiológicas como ecológicas, ocorrentes na natureza. Embora

bioensaios usando extratos feitos a partir de solventes orgânicos de diferentes polaridades não representem fielmente o que ocorre no ambiente, tais metodologias são importantes na identificação e na obtenção de substâncias bioativas, ampliando o conhecimento do potencial fitotóxico da planta (SOUZA FILHO *et al.*, 2010; SCOGNAMIGLIO *et al.*, 2013).

Tanto a avaliação de fitotoxidez, quanto os estudos alelopáticos, dependem de um esforço multidisciplinar, incluindo áreas da ciência tão diversas como Botânica, Química dos Produtos Naturais, Ecologia da Conservação, Ciências Agrárias, Microbiologia, Fisiologia Vegetal e Biologia Celular. Pode-se trabalhar em diferentes vertentes, desde a observação *in situ* de possível interferência planta-planta, até a identificação das substâncias fitotóxicas ou aleloquímicas, bem como seus mecanismos de ação. Além disso, existe uma demanda crescente a partir das Ciências Agrárias e da Ecologia para fins de manejo adequado de espécies produtoras dessas substâncias, e para o desenvolvimento de bioherbicidas (CHOU, 2006; MACÍAS *et al.*, 2019). De modo que não é surpreendente que, assim como nos primórdios das atividades agricultoras, alguns estudos atuais ainda recomendem a adição de restos vegetais de espécies alelopáticas para complementar ou mesmo substituir o uso de herbicidas ou da combinação destes (ABBAS *et al.*, 2018).

2.2. A Novel Weapon Hypothesis e Homeland Security

O avanço tecnológico e o desenvolvimento de novas metodologias para identificação das moléculas e dos seus efeitos nas plantas-alvo têm possibilitado o avanço sistemático da alelopatia como campo de estudo. Nos últimos anos, nota-se o crescente interesse na ecologia química e nos “biocomunicadores” como agentes mediadores de interações planta-planta ou da planta com o meio no qual está inserida (MACÍAS *et al.*, 2008, 2019).

Do ponto de vista ecológico, a alelopatia pode se expressar conforme o estabelecimento de interações coevolutivas entre a espécie emissora e a espécie receptora, e tem sido mencionada como responsável pela dominância de uma espécie sobre outra, estando presente em outros fenômenos ecológicos como sucessão ecológica e invasão de espécies exóticas (MACÍAS *et al.*, 2014).

Por todo o mundo, espécies exóticas têm sido introduzidas em novos ambientes para os mais diversos fins, incluindo fins medicinais, de paisagismo, e principalmente no manejo de culturas agrárias. Contudo, determinadas espécies exóticas podem se

estabelecer definitivamente em um novo habitat e exercerem dominância sobre as espécies nativas. Tais espécies passam a não ser somente exóticas, como também invasoras. As espécies exóticas invasoras têm sido alvo de preocupação de pesquisadores e ambientalistas por alterarem a flora e a fauna e por causarem perda de biodiversidade e de funções ecossistêmicas (INDERJIT, 2012; UDDIN & ROBINSON, 2017), bem como dificultarem o processo de regeneração de áreas degradadas e causarem danos econômicos em cultivos distintos (SOUZA-ALONSO *et al.*, 2017). As espécies exóticas geralmente dispõem de vantagens na sua nova vizinhança, como ausência de herbívoros e/ou patógenos naturais, o que as permite redirecionar recursos para maior crescimento e fecundidade (CALLAWAY & RIDENOUR, 2004; INDERJIT, 2012).

Em ecossistemas naturais, a manifestação da alelopatia pode depender dos fatores tempo e espaço. Segundo Rabotnov (1982, *apud* MALLIK & PELLISSIER, 2000), a coevolução de espécies que coexistem em uma dada área geográfica permite com que uma dada espécie receptora apresente resistência a aleloquímicos da espécie emissora. Posteriormente, Mallik & Pellissier (2000) observaram que a espécie alelopática *Vaccinium myrtillus* L. inibiu a germinação e o alongamento radicular da conífera exótica *Picea mariana* Mill., contudo esse efeito foi menor sobre *P. abies* (L.) H. Karst., a qual é simpátrica a *V. myrtillus*. Essas observações deram suporte a: (a) a ocorrência de efeito alelopático de uma espécie exótica sobre a comunidade vegetal local; e (b) a ocorrência de efeito alelopático de uma espécie local sobre uma espécie exótica recém-introduzida.

O fenômeno retratado em (a) foi denominado por Callaway & Ridenour (2004) como a *Novel Weapon Hypothesis* (NWH - em tradução livre: Hipótese da Arma Nova). De acordo com tal hipótese, determinadas espécies de plantas exóticas invasoras, através da introdução de metabólitos especiais inexistentes no seu novo ambiente, inibem o estabelecimento das nativas. As espécies invasoras geralmente não exercem tal dominância sobre as demais espécies do seu ambiente de origem, posto que as mesmas coevoluíram de modo a tolerar tais substâncias químicas (THORPE *et al.*, 2009). Contudo, com a introdução destes metabólitos em um novo ambiente, com os quais as plantas nativas não tiveram contato prévio, as espécies locais estão sujeitas a efeitos negativos sobre seu estabelecimento, sendo superadas pelas invasoras em longo prazo (CALLAWAY & RIDENOUR, 2004; KIM & LEE, 2011).

Desde então, a NWH tem sido testada com diferentes espécies invasoras em diferentes ecossistemas. Por exemplo, a (\pm)-catequina de exsudatos da invasora *Centaurea maculosa* Lam. inibiu o desenvolvimento inicial de outras espécies de plantas

do ambiente invadido (THORPE *et al.*, 2009). Tais autores observaram ainda que o mesmo efeito não se repetiu sobre plantas do seu ambiente original. Kim & Lee (2011) observaram que extratos de espécies invasoras inibiram o desenvolvimento inicial mais eficientemente que os de espécies nativas na Coreia do Sul. Em um outro estudo, a capacidade fotossintética de gametófitos de *Pteris multifida* Poir. foi mais afetada por exsudatos da espécie exótica *Bidens pilosa* L. do que pela espécie co-ocorrente *Coreopsis basalis* (A. Dietr.) S.F. Blake (ZHANG *et al.*, 2016). No entanto, a maioria dos trabalhos se limita a testar extratos ou exsudatos de espécies exóticas sobre espécies nativas ou espécies cultivadas (MORAVCOVÁ *et al.*, 2011; HARUN *et al.*, 2014; MADANY & SALEH, 2015; MATOUŠKOVÁ *et al.*, 2019). O efeito dos metabólitos de uma espécie invasora não é necessariamente direta, visto que efeitos indiretos incluem alteração da dinâmica da microbiota no solo (ABGRALL *et al.*, 2018), inibição do estabelecimento de fungos micorrízicos (HALE *et al.*, 2016; LIANG *et al.*, 2016; PINZONE *et al.*, 2018), e redução da abundância de populações bacterianas (HUANG *et al.*, 2017).

O fenômeno retratado em (b), a possibilidade reversa de metabólitos especiais de plantas nativas inibirem o desenvolvimento das espécies exóticas, dá suporte à hipótese da *Homeland Security* – HS. Essa teoria foi definida por Cummings *et al.* (2012) como a sensibilidade das espécies exóticas a aleloquímicos produzidos por espécies locais, diminuindo o efeito invasivo das espécies introduzidas. A observação desse fenômeno dá suporte ao uso de espécies nativas, inclusive em casos de replantio para recuperação de áreas, como uma alternativa de controle populacional das mesmas (CHRISTINA *et al.*, 2015).

A NWH e a HS têm sido contestadas por críticos, sobretudo ecologistas que preferem utilizar o viés da competição por recursos (DAVIS *et al.*, 2000). Isso se daria pela dificuldade em detectar efeitos alelopáticos na natureza que tenham impactos ecológicos efetivos (SHANNON-FIRESTONE & FIRESTONE, 2015). Até então, diferentes estudos em alelopatia e fitotoxidez adotavam, por praticidade, bioensaios em laboratório mais simples, adotando extratos de plantas ou restos de vegetação como tratamentos sobre poucas espécies-alvo e substrato geralmente estéril. Poucos eram, e ainda são, os trabalhos que avaliam a proporção relativa dos aleloquímicos de fato disponíveis na natureza, bem como outras variáveis, sejam essas bióticas ou abióticas, que moldam a alelopatia como fenômeno ecológico (HAGAN *et al.*, 2013; SHANNON-FIRESTONE & FIRESTONE, 2015).

2.3. Metabolismo Especial na Alelopatia

2.3.1. Diversidade química dos metabólitos especiais

Os metabólitos especiais – também denominados metabólitos secundários ou produtos naturais - são definidos como produtos metabólicos do metabolismo primário, não essenciais para a sobrevivência do organismo, e com distribuição variada de planta para planta (HARBORNE, 1999; LIMA & KAPLAN, 2010; YANG *et al.*, 2018). Essas substâncias apresentam grande diversidade estrutural e espacial, por serem resultados da combinação de fatores genéticos com resposta a fatores ambientais, como estresses, danos de origem biótica e mudanças climáticas (LIMA & KAPLAN, 2010; YANG *et al.*, 2018). Os metabólitos especiais apresentam grande importância ecológica, pois atuam na proteção contra herbívoros e patógenos, na atração de polinizadores ou dispersores. Essas micromoléculas também interferem na simbiose planta-micro-organismo e em interações planta-planta, dentre as quais a alelopatia (HARTMANN, 2007; MACÍAS *et al.*, 2007, 2019).

Seguindo a clássica definição de alelopatia, uma planta emissora produz e libera ao ambiente, substâncias químicas que podem causar efeitos positivos e negativos no crescimento e/ou no estabelecimento de outra planta, receptora. As substâncias químicas responsáveis pelo efeito alelopático são denominadas aleloquímicos (FERREIRA & AQUILA, 2000; REIGOSA *et al.*, 2013). Segundo a IAS (1996), os agentes causadores do efeito alelopático são, via de regra, metabólitos especiais. Outros autores estendem a definição de aleloquímicos para alguns fitormônios, ácidos graxos, carboidratos, aminoácidos e oligopeptídeos (MACÍAS *et al.*, 2007; FAROOQ *et al.*, 2013).

Os metabólitos especiais são classificados mais frequentemente de acordo com sua origem biossintética. Dentre as classes químicas, as consideradas principais na literatura são as substâncias nitrogenadas (alcaloides), as substâncias fenólicas (fenilpropanoides e flavonoides) e os terpenoides (HARBORNE, 1999; REIGOSA *et al.*, 2013; KABERA *et al.*, 2014; SHITAN, 2016; YANG *et al.*, 2018). Outras classificações foram propostas por Oksman-Caldentey & Inzé (2004) e Lv *et al.* (2014), também de acordo com a biossíntese (Tabela 1). As principais alterações incluíam a segregação das substâncias fenólicas em duas classes (fenilpropanoides e flavonoides), e a adição de uma quinta classe. Existem diferentes relatos de metabólitos especiais de diferentes classes atuando como aleloquímicos, principalmente alcaloides (WINK, 2003; VILLA-RUANO *et al.*, 2012; NEBO *et al.*, 2014), substâncias fenólicas e terpenoides (Figura 1).

Tabela 1. Propostas de classificação dos metabólitos especiais.

Oksman-Caldentey & Inzé (2004)	Ly <i>et al.</i> (2014)
Alcaloides	Substâncias nitrogenadas
Policetídeos	Metabólitos derivados do açúcar
Fenilpropanoides	Fenilpropanoides
Flavonoides	Flavonoides
Terpenoides	Terpenoides

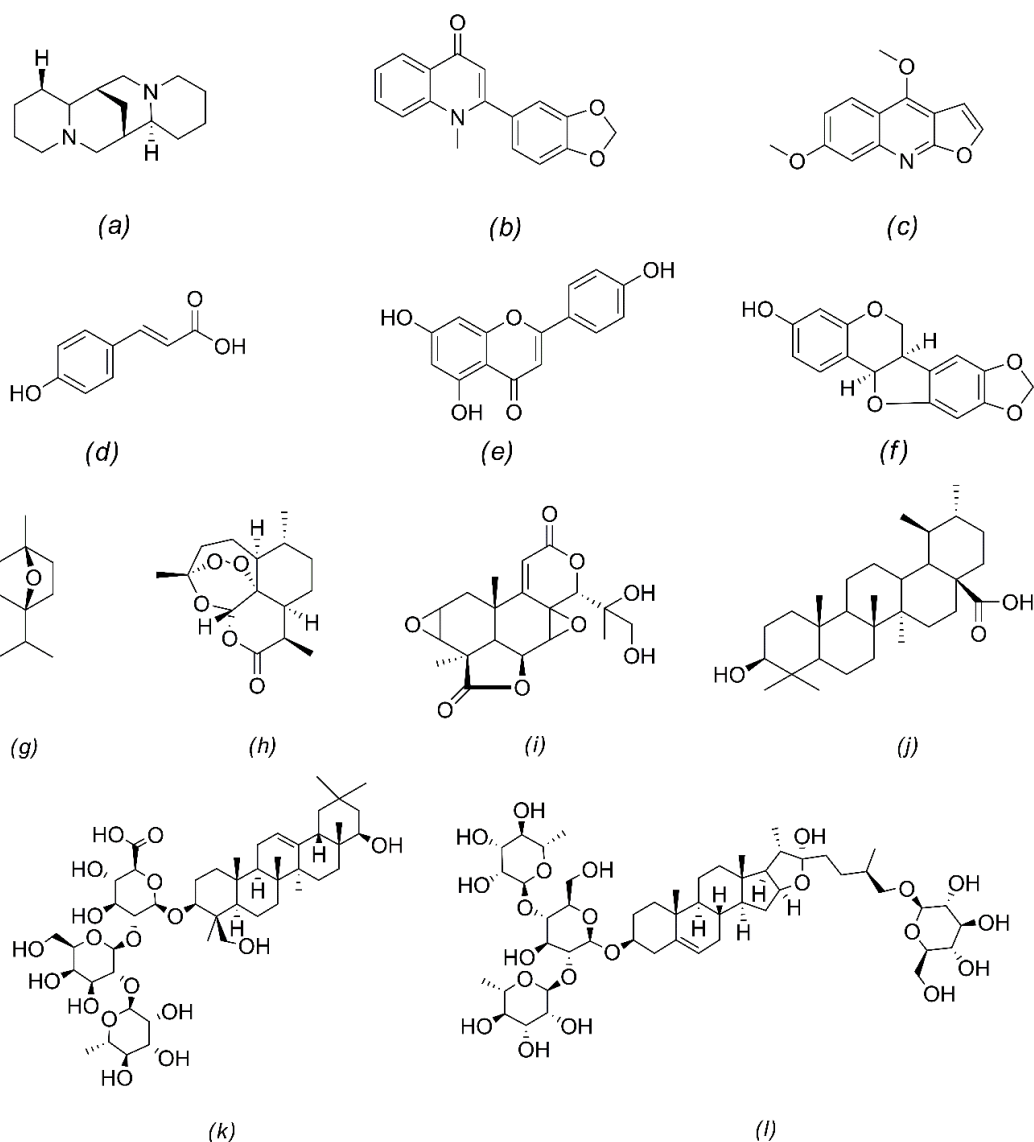


Figura 1. Exemplos de metabólitos especiais que podem atuar como aleloquímicos. (a) Esparteína, alcaloide lupínico (VILLA-RUANO *et al.*, 2012). (b) Graveolina, alcaloide isoquinolínico (SAMPAIO *et al.*, 2018). (c) Evolitrina, alcaloide quinolínico (NEBO *et al.*, 2014). (d) Ácido *p*-cumárico, um ácido hidroxicinâmico (SOUZA FILHO *et al.*, 2005). (e) Apigenina, uma flavona (LIU *et al.*, 2011). (f) Maackiaina, um pterocarpano (LIU *et al.*, 2013). (g) 1,4-cineol, um monoterpene (CAI & GU, 2016). (h) Artemisinina, um sesquiterpene (HUSSAIN & REIGOSA, 2014). (i) Podolactona B, um diterpene (RIAL *et al.*, 2016a). (j) Ácido ursólico, um triterpene (WANG *et al.*, 2014). (k) Soyasaponina I, uma saponina triterpenoídica (PÉREZ *et al.*, 2015). (l) Protodioscina, uma saponina esteróidica (LOZANO *et al.*, 2017).

As substâncias fenólicas, que têm como base estrutural um grupo hidrocarboneto aromático ligado a um radical hidroxila, podem ser originadas da via do chiquimato, da via do acetato/malonato, ou pela combinação das duas vias biossintéticas (LIMA & KAPLAN, 2010). Apresentam grande diversidade de tipos (Figura 1), incluindo os fenilpropanoides, como os ácidos fenólicos e hidroxicinâmicos, flavonoides, isoflavonoides, e polifenóis mais complexos, como taninos e antocianinas (BRAVO, 1998; CHEYNIER *et al.*, 2013). Para a planta, podem ser um componente estrutural ao compor a lignina, bem como agentes de proteção contra herbívoros e patógenos (LI *et al.*, 2010). Diferentes substâncias fenólicas são liberadas ao solo via exsudação radicular, sofrendo transformações bióticas e abióticas nesse novo meio (INDERJIT, 1996; QIN *et al.*, 2014). Dentre os diferentes tipos, os ácidos hidroxicinâmicos e os flavonoides podem inibir a germinação e causar necrose no ápice radicular, e também inibir a divisão e o alongamento celular (EINHELLIG, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2015; ASLANI *et al.*, 2016; FEITOZA *et al.*, 2018).

Os terpenoides (Figura 1) são formados a partir da polimerização de unidades de isopreno (C_5H_8). Tais unidades são derivadas do dimetilalil difosfato (DMAPP) e/ou de seu isômero isopentenil difosfato (IPP), os quais podem ser produzidos a partir da via biossintética do mevalonato ou da via metileritritol fosfato (TETALI, 2019). Podem ser classificados de acordo com o número de unidades de isopreno, podendo ser monoterpenos (duas unidades), sesquiterpenos (3), diterpenos (4) e triterpenos (6). Podem tanto participar do metabolismo primário ao compor pigmentos fotossintéticos, fitormônios de crescimento e membranas celulares, como também costumam integrar os óleos essenciais de plantas (CARSON & HAMMER, 2011).

Os monoterpenos têm sido descritos como aleloquímicos importantes, inibindo tanto a germinação de sementes quanto o comprimento das plantas-alvo (VOKOU *et al.*, 2003; PAWLOWSKI *et al.*, 2012). Os sesquiterpenos compõem os óleos essenciais, assim como os monoterpenos, e as lactonas sesquiterpênicas são aleloquímicos bastante conhecidos (HUANG *et al.*, 2009; HUSSAIN & REIGOSA, 2014; RIAL *et al.*, 2016b). Os diterpenos inibem a germinação e o crescimento inicial das plantas-alvo, ainda que esse potencial fitotóxico seja inferior ao das lactonas sesquiterpênicas (RIAL *et al.*, 2016b; ZHAO *et al.*, 2018). Os diterpenoides também podem atuar em outros processos, como na inibição da nitrificação biológica no solo (SUBBARAO *et al.*, 2009). Os triterpenoides são um grupo bastante grande e diverso de substâncias (XU *et al.*, 2004). Devido ao grande peso molecular, não compõem óleos essenciais como os monoterpenos

e os sesquiterpenos, contudo podem se acumular no solo, e inibir germinação de sementes, alongamento da radícula e o funcionamento do fotossistema II (PSII) do tilacoide, como no caso do ácido ursólico (WANG *et al.*, 2014).

As saponinas são tipicamente glicosídeos de triterpenoides ou de esteroides, que podem ser liberadas pelas plantas por exsudação ou decomposição de suas partes (KOCAÇAHÇKAN *et al.*, 2009; THAKUR *et al.*, 2011). Sua estrutura química de cauda-cabeça confere às saponinas diversidade de atividades biológicas, incluindo pesticida, inseticida, molusquicida e fungicida, além de surfactante (FAIZAL & GEELLEN, 2013). A fitotoxidez das saponinas foi reportada por diferentes autores (OLESZEK, 1993; PÉREZ *et al.*, 2015; NEPOMUCENO *et al.*, 2017), e o principal modo de ação dessas substâncias se dá pela sua interação com as membranas celulares (THAKUR *et al.*, 2011).

2.3.2. Interações bióticas e abióticas na disponibilidade dos aleloquímicos

Os aleloquímicos podem ser liberados ao ambiente através de lixiviação, volatilização, exsudação radicular ou pela decomposição de resíduos vegetais (FERREIRA & AQUILA, 2000; REIGOSA *et al.*, 2013). Quando liberados no solo, podem estar sujeitos às características físico-químicas do solo, as quais afetam diretamente a adsorção, dessorção e degradação dos aleloquímicos no solo, alterando a disponibilidade dos mesmos (KOBAYASHI, 2004; JILANI *et al.*, 2008). Os aleloquímicos também estão sujeitos a alterações via ação microbiana. Por exemplo, bactérias do gênero *Pseudomonas* são responsáveis pela conversão de (-)-catequina, aleloquímico produzido por *Rhododendron formosanum*, em ácido protocatecuico. Este aleloquímico apresenta maior capacidade de inibição da germinação e do desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L. (alface), em comparação com a (-)-catequina (WANG *et al.*, 2013).

Outro ponto importante é a interação entre aleloquímicos distintos, que pode potencializar ou diminuir o efeito inibitório, em comparação com substâncias isoladas. Dentro do contexto da alelopatia, são comuns os termos como, efeito aditivo, sinergismo e antagonismo. O efeito aditivo é a soma dos efeitos entre duas ou mais substâncias, indicando ausência de interação (GARCÍA *et al.*, 2015; GALINDO *et al.*, 2017). É considerado sinergismo quando o efeito conjunto de duas ou mais substâncias é superior ao da soma dos efeitos de cada aleloquímico (SILVA *et al.*, 2013; GARCÍA *et al.*, 2015). O antagonismo implica na redução da atividade inibitória a níveis inferiores em comparação com cada substância isoladamente (VOKOU *et al.*, 2003; LOBO *et al.*, 2010;

SILVA *et al.*, 2013; RIAL *et al.*, 2016a). Apesar dessas definições, a interação entre aleloquímicos é um fenômeno complexo e pode variar de espécie para espécie (SOUZA FILHO, 2006). A variação interespecífica da resposta ao efeito alelopático depende da capacidade da planta-alvo em detoxificar ou compartimentalizar os aleloquímicos (SHAH *et al.*, 2016). Ainda, algumas espécies vegetais podem ter efeito de alelomeiação, isto é, favorecer o desenvolvimento da espécie alvo através de modificação nos meios físico e biológico (ITO *et al.*, 2015).

2.4.Efeitos dos aleloquímicos sobre as plantas-alvo

Os diferentes aleloquímicos, quando em contato com as plantas-alvo, podem causar interferências sobre distintos estágios de desenvolvimento vegetal, tais como a germinação de sementes e o desenvolvimento inicial de plantas jovens (FERREIRA & AQUILA, 2000; REIGOSA *et al.*, 2013). Apesar do conceito básico de alelopatia prever interferências tanto positivas como negativas, a tendência observada é de fitotoxidez, a qual apresenta maior relevância nos contextos agrário e ecológico (MACÍAS *et al.*, 2014).

2.4.1. Germinação e desenvolvimento inicial

A inibição da germinação ou a redução da velocidade da germinação são observadas com frequência nos bioensaios, e a maioria dos trabalhos relacionados à alelopatia se atém à avaliação da germinação de sementes (EINHELLIG, 2004; SOUZA FILHO *et al.*, 2005; RIBEIRO, 2012). De acordo com García-Sánchez *et al.* (2012) (2012) e Sunmonu & Van Staden (2014), substâncias fenólicas podem inibir a atividade das giberelinas. Essa classe de fitormônios regula enzimas relativas à germinação, dentre estas a α -amilase, enzima responsável pela hidrólise do amido de reserva e pela geração de energia na forma de açúcares solúveis (MIGNONI *et al.*, 2018). A diidrochalcona myrigalona A inibe o metabolismo e a sinalização das giberelinas, e consequentemente inibe o acúmulo de radicais superóxido necessários para a ruptura do endosperma e protrusão da radícula (ORACZ *et al.*, 2012). Por outro lado, monoterpênos podem interferir na germinação ao inibir a cadeia transportadora mitocondrial e afetar a integridade da membrana (DE ANDRADE SANTIAGO *et al.*, 2017).

Indivíduos expostos aos aleloquímicos geralmente apresentam raízes curtas, espessas e deformadas (RIBEIRO *et al.*, 2015). Outros autores relataram que substâncias fitotóxicas, como as substâncias fenólicas, podem afetar a densidade de pêlos absorventes (PINA, 2008; CIPRIANI *et al.*, 2014). Essas características apresentam relação com a

interação entre os mesmos com hormônios vegetais, dentre os quais as auxinas e as citocininas (LIU *et al.*, 2017). As auxinas promovem o crescimento do meristema apical da raiz, o alongamento da raiz, a diferenciação das raízes laterais e a formação dos pêlos absorventes (WERNER *et al.*, 2003; TEALE *et al.*, 2005; BIELACH *et al.*, 2012; SAINI *et al.*, 2013). Juntamente com as citocininas e o etileno, as auxinas regem o crescimento do corpo da planta através da regulação da divisão celular, da mobilização de nutrientes e da diferenciação dos tecidos condutores – xilema e floema (ALONI *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2017).

Durante o desenvolvimento da raiz, os processos de divisão, alongamento e diferenciação celular passam por uma ajustada regulação dependente dos fitormônios. As auxinas promovem a divisão celular ao antagonizar a atividade das citocininas, enquanto as citocininas promovem a diferenciação celular em detrimento da divisão (CHIAPPETTA *et al.*, 2011), e o balanço entre as duas classes de fitormônios regula o tamanho do meristema subapical (DELLO IOIO *et al.*, 2008). As auxinas também promovem o alongamento celular ao aumentar a extensibilidade da parede celular. Esse alongamento depende da atividade das proteínas expansinas, que atuam no afrouxamento das ligações das macromoléculas estruturais da parede celular. A atividade das expansinas é regulado pelo baixo pH (4,5-6,0), mantido pela atividade das bombas H⁺-ATPase da membrana plasmática, também sob controle das auxinas (LIU *et al.*, 2017; MAJDA & ROBERT, 2018).

As auxinas são transportadas de célula a célula com auxílio das glicoproteínas transportadoras MDR/P, AUX e PIN, caracterizando o transporte polar basípeto (BESSEAU *et al.*, 2007). Essas proteínas são os principais alvos de diferentes grupos de aleloquímicos. Os terpenoides atuam diretamente sobre a inibição de PIN (GRAÑA *et al.*, 2013; ARANITI *et al.*, 2017), enquanto alcaloides afetam a expressão de PIN e AUX1 (HU *et al.*, 2015). Os flavonóis podem afetar o transporte polar das auxinas ao inibirem as MDR/P e se ligarem com o complexo proteico ligante do ácido naftilptalâmico – NBP (BESSEAU *et al.*, 2007; CHEYNIER *et al.*, 2013). Outro mecanismo de desbalanço das auxinas se dá pela degradação das mesmas via peroxidase e AIA-oxidase, estimuladas pelas flavonas (MATHESIUS, 2001)

2.4.2. Anatomia e ultraestrutura das plantas-alvo

O ápice radicular é considerado a região mais sensível da raiz, e a raiz costuma ser mais susceptível a variados tipos de estresse em comparação com outras partes do

corpo da planta (FERREIRA & AQUILA, 2000). Dessa forma, as avaliações anatômicas e ultraestruturais nas raízes podem nos fornecer informações sobre o efeito fitotóxico de determinada substância, bem como indicar seu possível modo de ação. A alteração no tamanho e na forma das células é um primeiro indicativo de efeito fitotóxico na espécie-alvo. Um exemplo foi a redução de tamanho das células do meristema apical do feijão (*Phaesolus vulgaris* L. - Fabaceae) após a aplicação de extrato aquoso de *Sicyos deppei* G. Don. (Cucurbitaceae) (CRUZ-ORTEGA *et al.*, 1998), indicando inibição do alongamento celular nessa região. Chon *et al.* (2002) observaram que as raízes de *Medicago sativa* L. (alfafa) apresentaram inibição da divisão e do alongamento celular, e maior diâmetro total, após tratamento com extratos aquosos da própria alfafa ou com a substância isolada cumarina. Os autores atribuíram essa variação ao aumento do número de camadas corticais e ao maior diâmetro do cilindro central. O mesmo foi observado para *Calopogonium mucunoides* Desv. (Fabaceae), cujas raízes apresentaram menores comprimentos, maiores diâmetros, e maior diferenciação celular, após tratamento com ácidos hidroxicinâmicos e flavonoides (RIBEIRO *et al.*, 2015; FEITOZA *et al.*, 2018). Uma derivada da cumarina, a escopoletina, causou alterações na forma, tamanho e organização das células na região da coifa e do meristema subapical, incluindo zonas de diferenciação mais estreitas que o normal (GRAÑA *et al.*, 2017). Extratos vegetais e substâncias fitotóxicas podem também causar redução do comprimento de elementos de vaso em raízes (IMATOMI *et al.*, 2013; HABERMANN *et al.*, 2016), como reflexo da inibição do alongamento celular.

Alguns autores observaram alterações na ultraestrutura celular após tratamento com extratos vegetais ou com aleloquímicos isolados. Geralmente, as membranas plasmáticas e as organelas que compõem o complexo de endomembranas são as mais afetadas por essas micromoléculas. O extrato aquoso de *Sicyos deppei* G. Don. causou alterações na forma dos plastídios, e na formação de pequenos vacúolos, processo conhecido como vacuolização, em células do ápice radicular do feijão (*Phaesolus vulgaris* L.) e da abóbora-chila (*Cucurbita ficifolia* Bouché) (CRUZ-ORTEGA *et al.*, 1998). Essas mesmas alterações foram observadas após tratamento com os aleloquímicos 2(3*H*)-benzoxazolinona (BOA) e 2,4-diidróxi-1,4(2*H*)-benzoxazin-3-ona (DIBOA) (BURGOS *et al.*, 2004). O ácido *p*-cumárico e o flavonol canferol causaram alterações nas mitocôndrias das células de raízes de *Calopogonium mucunoides*, tais como degradação da matriz e inchaço ou rompimento de suas cristas (FEITOZA *et al.*, 2018), e o mesmo efeito foi observado após tratamento com cumarinas (SUKSUNGWORN *et*

al., 2017). Essas micromoléculas também podem afetar a forma e a integridade do núcleo, atuando principalmente sobre a membrana nuclear e a cromatina. As substâncias fenólicas podem causar alterações na forma do envoltório nuclear (BURGOS *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 2017), condensação da cromatina (FEITOZA *et al.*, 2018) e aberrações cromossômicas (GULZAR *et al.*, 2016).

Esses efeitos na ultraestrutura celular podem estar relacionados com o estresse oxidativo causado por essas substâncias fitotóxicas. Sabe-se que o ácido cinâmico e seus derivados podem causar incremento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na peroxidação lipídica das membranas celulares (YE *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2015; DING *et al.*, 2016). Assim como as substâncias fenólicas, os terpenoides também podem causar estresse oxidativo (SINGH *et al.*, 2006, 2009). Tanto a disfunção mitocondrial quanto o estresse oxidativo podem induzir à morte celular programada (MCP) (GRAÑA *et al.*, 2017; ARANITI *et al.*, 2018).

2.4.3. Fotossíntese e outros processos fisiológicos

Diferentes aleloquímicos podem afetar processos fisiológicos, como por exemplo, a eficiência fotossintética das plantas-alvo. Tipicamente a fotossíntese é constituída de duas fases interdependentes. A fosforilação oxidativa basicamente converte a energia luminosa em uma cadeia transportadora de elétrons entre proteínas de membrana, incluindo os fotossistemas II e I, além de gerar ATP e NADPH como produtos. A etapa bioquímica corresponde à assimilação do CO₂ pela enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, a rubisco (TAIZ & ZEIGER, 2013).

O fotossistema II (PSII) é um complexo proteico situado nas membranas dos tilacoides. O papel do PSII é receber a energia luminosa, utilizando a clorofila *a* como principal pigmento receptor de luz, convertê-la em energia eletroquímica e reduzir a plastoquinona, dando início a cadeia transportadora de elétrons (HUSSAIN & REIGOSA, 2011; TAIZ & ZEIGER, 2013). O efeito das substâncias fitotóxicas sobre o PSII pode ser produzido de diferentes formas, seja por alteração dos níveis das clorofilas *a* e *b* (CHENG & CHENG, 2015; PAN *et al.*, 2015), por interrupção da cadeia transportadora de elétrons (HUSSAIN *et al.*, 2011), ou diretamente sobre os centros de reação do PSII (LÜTTGE *et al.*, 2015). A identificação do modo de ação dessas substâncias pode ser realizada através da avaliação da eficiência quântica potencial, F_v/F_m , e na eficiência quântica efetiva, Φ_{PSII} (CHENG & CHENG, 2015).

O PSII é um dos principais alvos dos aleloquímicos. Exsudatos radiculares de picão-preto (*Bidens pilosa* L.) causaram redução nos teores das clorofilas e carotenoides, bem como diminuição das taxas de transporte de elétrons e da eficiência quântica do PSII (ZHANG *et al.*, 2016). Resíduos da parte aérea das espécies forrageiras *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster, *Melinis minutiflora* P. Beauv e *Paspalum notatum* Flügge afetaram de forma dose-dependente a F_v/F_m e a Φ_{PSII} (ARAÚJO *et al.*, 2018). Dentre as substâncias puras cujo efeito sobre o PSII é conhecido, encontram-se as benzoxazolinonas e as benzoquinonas (HUSSAIN & REIGOSA, 2011; HUSSAIN *et al.*, 2011) e o ácido ursólico (WANG *et al.*, 2014).

Dentre as outras interferências em nível fisiológico, os aleloquímicos podem afetar a condutância estomática (FU *et al.*, 2019), a absorção de água, íons e outros nutrientes (BAZIRAMAKENGA *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2010; HARUN *et al.*, 2014), assim como a transpiração (BLUM & GERIG, 2005), e a produção de ATP nas mitocôndrias (TAKAHASHI *et al.*, 1998). Outros processos afetados por essas substâncias são a síntese de proteínas, atividade enzimática e potencial hídrico (LI *et al.*, 2010; LATIF *et al.*, 2017).

Ferreira & Áquila (2000) ressaltam que são fundamentais a observação e a descrição de possíveis alterações morfológicas provenientes do tratamento com tais substâncias para o maior entendimento da fitotoxidez dos mesmos. Essas observações podem utilizar como base a raiz, visto que seu crescimento inicial apresenta altas taxas metabólicas e é importante para o estabelecimento da planta no ambiente. Além disso, a atividade de absorção de nutrientes confere às raízes alta susceptibilidade a estresses ambientais, dentre os quais as substâncias fitotóxicas (CRUZ-ORTEGA *et al.*, 1998).

2.5. *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga

O gênero *Urochloa* P. Beauv. pertence à tribo Melinidinae, família Poaceae, reunindo cerca de 100 espécies de distribuição pantropical (THE PLANT LIST, 2019). Anteriormente, a grande maioria dessas espécies pertencia ao gênero *Brachiaria* (Trin.) Griseb. Embora a atual circunscrição tenha sido sustentada por sequências de DNA ribossômico e caracteres morfológicos relativos à inflorescência, como a orientação das espiguetas (MORRONE & ZULOAGA, 1992; TORRES GONZÁLEZ & MORTON, 2005), estudos filogenéticos mais recentes questionam se *Urochloa* é de fato um grupo monofilético (SALARIATO *et al.*, 2010; PESSOA-FILHO *et al.*, 2017).

A partir dos anos 1960, houve um aumento na demanda de biomassa para nutrição do gado bovino no Brasil. Como as gramíneas nativas não apresentam potencial forrageiro significativo (PIZARRO *et al.*, 1996), espécies exóticas foram introduzidas a partir daquela década, sendo oriundas principalmente da África e da Austrália (GARCEZ, 2013). Naturalmente, as espécies do gênero *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) se destacaram dentre os demais gêneros trazidos para formação de pastagens, devido às seguintes características: alta biomassa produzida, tolerância a solos pobres e ácidos (BERNARDI *et al.*, 2012), excelente resposta à adição de fertilizantes (AMBIEL *et al.*, 2008) e agressividade na competição com outras invasoras (MACHADO *et al.*, 2010).

A introdução dessas pastagens a partir da década de 60 e os crescentes investimentos logísticos e tecnológicos no agronegócio intensificaram o uso da terra, e a ampliação das áreas de pastagem se deu à custa da remoção da vegetação nativa ou de culturas anteriores, sendo um fator preocupante considerando a perda progressiva da biodiversidade (BARONA *et al.*, 2010). Atualmente, a área ocupada por pastagens plantadas supera os 111 milhões de hectares no Brasil e os 670 mil hectares no estado do Rio de Janeiro (IBGE, 2017). Estima-se que *Urochloa* represente uma ocupação de aproximadamente 95 milhões de hectares de pastagens brasileiras distribuídas pelo Cerrado e pela Mata Atlântica, muitas vezes sendo manejadas inadequadamente, subutilizadas ou mesmo abandonadas (FERREIRA *et al.*, 2010). As principais espécies de *Urochloa* cultivadas como forrageiras são *U. decumbens* (Stapf) R.D.Webster, *U. brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D.Webster e *U. humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga (MACHADO *et al.*, 2010; JANK *et al.*, 2014).

Aproximadamente 10 milhões de hectares de pastagens são compostos por *U. humidicola* (IBGE, 2006), denominada vulgarmente como “capim-humidícola” ou “quicuío-da-amazônia” (Figura 2). Essa espécie tem como origem o leste africano, tendo sido introduzida em outras regiões tropicais, incluindo Austrália e Brasil. Caracteriza-se por ser uma erva perene rizomatosa, podendo atingir 1 m de altura. Suas folhas são curtas e lanceoladas, denticuladas no ápice (SEIFFERT, 1980), permitindo diferenciação morfológica das demais espécies cultivadas para o mesmo fim. Apesar do menor potencial nutricional em comparação com as demais espécies do gênero, *U. humidicola* se destacou pela ótima adaptação a solos pouco drenados e pela resistência maior à pressão de pastejo (OLIVEIRA, 2000). Destaca-se também pela alta produção de sementes, as quais podem apresentar dormência por largos períodos (AJALA-LUCCAS *et al.*, 2018). Além disso, *U. humidicola* se mostrou resistente à cigarrinha-das-pastagens,

que assolou as pastagens e outras culturas nos anos 1970. Essa praga, causada pelo inseto hemíptero sugador de seiva *Deois flavopicta* Stal, causou enorme perda na produtividade vegetal, estando visível no amarelecimento da parte aérea (KARIA *et al.*, 2006; CRUZ *et al.*, 2010).

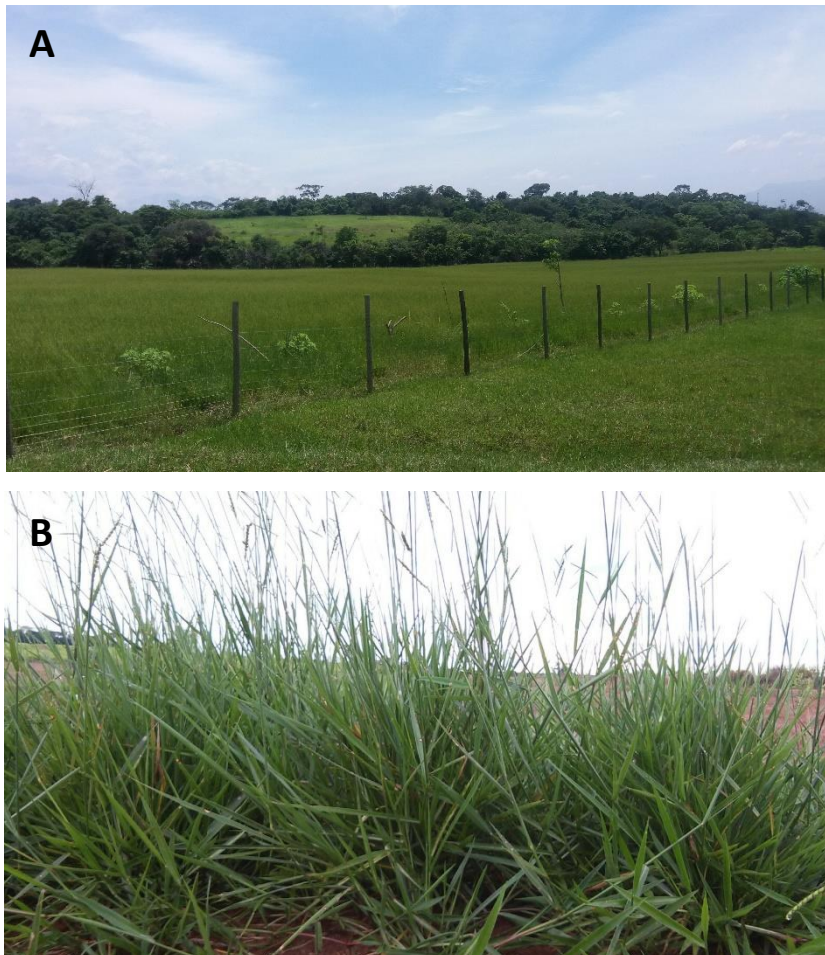


Figura 2: *Urochloa humidicola* (capim-braquiária). A. Pastagem com monodominância de *U. humidicola*, localizada no Instituto de Zootecnia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. B. Hábito da espécie (Fonte: Roberta C. Ribeiro).

Depois que as espécies de *Urochloa* foram introduzidas no Brasil para fins forrageiros, as mesmas passaram a dominar rapidamente sobre as espécies nativas (RIBEIRO *et al.*, 2012). Ao encontrar ambiente favorável para estabelecimento, essas espécies se tornam invasoras, aumentando sua área de cobertura e causando perdas na biodiversidade local (FERREIRA *et al.*, 2016). Isso pode ser explicado pela degradação do solo ao longo do tempo, resultando em solos mais pobres em nutrientes (PERON & EVANGELISTA, 2004; PEREIRA *et al.*, 2009), e também pela já mencionada agressividade da espécie introduzida ao novo ambiente. Por vezes, esse domínio tem sido atribuído, do ponto de vista fisiológico, ao mecanismo fotossintético C₄ das gramíneas

tropicais, o que confere às mesmas um ciclo reprodutivo mais rápido, maiores taxas fotossintéticas e conseqüentemente, maior vantagem na competição por nutrientes (RIBEIRO, 2012; DE FARIA *et al.*, 2015).

O gênero *Urochloa* tem sido reconhecido, do ponto de vista químico, como produtor de substâncias fenólicas no geral, bem como de terpenoides e saponinas. Estudos fitoquímicos com a parte aérea de *U. brizantha*, *U. decumbens*, *U. ruziziensis*, *U. mutica* e *U. plantaginea* identificaram ácidos fenólicos e hidroxicinâmicos – ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, clorogênico e protocatecuico, flavonoides O- e C-glicosilados, norisoprenoides como (6,9)-3-oxo-alfa-ionol, triterpenoides como a friedelina e o epifriedelinol, e uma variedade de saponinas esteroídicas que inclui a dioscina, a protodioscina e a protoneodioscina (PIRES *et al.*, 2002; CHITINDINGU *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008; KATO-NOGUCHI *et al.*, 2014; PÉREZ *et al.*, 2016; NEPOMUCENO *et al.*, 2017).

Estudos fitoquímicos com *U. humidicola* têm sido menos frequentes. Em um estudo mais extenso, Oliveira *et al.* (2017) identificaram no extrato hidrometanólico da parte aérea os ácidos *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxibenzoico e vanílico, e também flavonoides como quercetina-3-O-ramnosídeo, canferitrina e tricina. Nas raízes, os mesmos autores detectaram duas saponinas esteroidais, (dioscina e 3-O-ramnosil (1-4) [ramnosil (1-2)] glicosilspenogenina) e um polifenol catequina-7-O-glicosídeo.

Essa diversidade química reflete nas interações das espécies de *Urochloa* com o ambiente. Existem extensos registros na literatura de que essas espécies apresentam toxicidade para animais, como caprinos, bovinos e ovinos. A ingestão excessiva de saponinas esteroídicas pode causar fotosensibilização nesses animais, caracterizada por formação de cristais biliares, intoxicação hepática, perda de peso, apatia e lesões na pele (RIET-CORREA *et al.*, 2011; LEAL *et al.*, 2016; CHUNG *et al.*, 2018).

A atividade fitotóxica das micromoléculas encontradas em *Urochloa* poderia justificar o estabelecimento e a invasão das espécies de *Urochloa* introduzidas como forrageiras, dentro dos conceitos apresentados na *Novel Weapon Hypothesis*. A maioria dos trabalhos, que testou a fitotoxicidade de extratos ou substâncias encontradas em tais espécies, observou inibição da germinação e do desenvolvimento inicial das espécies-alvo. Por exemplo, extratos e exsudatos radiculares de *U. brizantha* e *U. subquadriflora* (Trin.) R.D.Webster inibiram a germinação de sementes de *Raphanus sativus* L. (rabanete), *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomate), *Capsicum annum* L. (pimenteira), *Crotalaria juncea* L. (crotalária-juncea) e *Chromolaena odorata* (L.) King & H.E.

Robins. (erva-do-sião) (SENARATHNE *et al.*, 2010). Trabalhos semelhantes foram também conduzidos com extratos aquosos ou etanólicos de *U. decumbens* (BARBOSA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2016), e com solo de pastagens de *U. brizantha* (CARVALHO *et al.*, 1993; MARTINS *et al.*, 2006), todos indicando efeito inibitório sobre espécies-alvo distintas.

Para a espécie *U. humidicola*, Ribeiro *et al.* (2012) observaram que o hidrolato e a água de decocção de raízes e da parte aérea inibiram a germinação de sementes das leguminosas *Calopogonium mucunoides* Desv. (calopogônio), *Macrotyloma axillare* (E.Mey.) Verdc. e *Desmodium ovalifolium* Merr. (desmódio). Souza Filho *et al.* (2005) isolaram da parte aérea o ácido *p*-cumárico, que inibiu a germinação e o crescimento da radícula de *Cassia occidentalis* L. (fedegoso), *Mimosa pudica* L. (malícia) e *Senna obtusifolia* (L.) Irwin & Barneby (mata-pasto), sendo todas plantas daninhas.

Dentre os resultados prévios obtidos (FEITOZA *et al.*, 2018), foi possível observar que o extrato hidrometanólico de folhas de *U. humidicola* inibiu o crescimento radicular de *Calopogonium mucunoides* Desv. Além disso, o ácido *p*-cumárico, detectado nas folhas de *U. humidicola*, causou alterações em nível estrutural, com estrutura anatômica caulinar formada mais próxima ao ápice radicular, e em nível ultraestrutural, com degradação de núcleo e mitocôndrias nas células radiculares.

É importante destacar que *U. humidicola* apresenta um sistema radicular que pode atingir 0,7 m de profundidade (COSTA *et al.*, 2002), o que tornaria esse órgão uma fonte importante de produção de metabólitos especiais. Até a presente data, somente o estudo de Ribeiro *et al.* (2012) avaliou a interferência dessas raízes sobre o desenvolvimento de outras espécies vegetais, não incluindo espécies nativas de ambientes invadidos por *U. humidicola*. A composição fitoquímica de suas raízes é também pouco conhecida, conforme citado anteriormente, e é importante para a melhor compreensão dos mecanismos de *U. humidicola* na invasão dos ecossistemas naturais para que se tenha um manejo adequado dessas pastagens ou fornecer subsídios para restaurar ambientes invadidos (THOMAS *et al.*, 2019).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar possíveis efeitos fitotóxicos da espécie exótica *Urochloa humidicola* sobre espécies-alvo padrões e nativas, sob os pontos de vista morfológico, fitoquímico, estrutural, ultraestrutural e fisiológico.

3.2. Objetivos Específicos

Capítulo 1:

- Avaliar o efeito dos componentes do substrato de áreas com monodominância de *Urochloa humidicola* sobre o desenvolvimento inicial de espécies nativas.
- Avaliar o efeito do substrato das espécies nativas sobre o desenvolvimento inicial de *U. humidicola*.

Capítulo 2:

- Avaliar o efeito, na germinação e no desenvolvimento inicial de diferentes espécies-alvo, de extratos aquosos e partições provenientes de raízes de *U. humidicola*.
- Caracterizar estruturalmente as raízes das espécies-alvo após cada tratamento e avaliar as possíveis alterações.
- Identificar alterações ultraestruturais nas células das raízes das espécies-alvo.
- Realizar estudo fitoquímico dos extratos das raízes de *U. humidicola*.

Capítulo 3:

- Avaliar o efeito de cada tratamento sobre a acidificação da rizosfera dependente de H⁺-ATPase de membrana, nas raízes da espécie-alvo.
- Avaliar a eficiência quântica do fotossistema II após cada tratamento, utilizando parâmetros da fluorescência da clorofila.

CAPÍTULO 1

Avaliação do efeito de aleloquímicos ocorrentes em substratos oriundos de pastagens de *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga ou cultivados com espécies nativas da Mata Atlântica

Rodrigo Barbosa Braga Feitoza¹; Helena Regina Pinto Lima²; Renato de Souza Fernandes Jr.³; Luiz Fernando Duarte de Moraes³; Maura Da Cunha¹

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Setor de Biologia Vegetal, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

²Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Botânica, Seropédica, RJ, Brasil.

³ EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica, RJ, Brasil.

Resumo

A espécie exótica *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga (Poaceae) tem impactado negativamente ecossistemas nativos no Brasil devido ao potencial invasor sobre ecossistemas nativos. Hipotetizamos que a presença de metabólitos especiais em *Urochloa* exerce efeito alelopático e inibe o desenvolvimento inicial de outras plantas, incluindo de espécies arbóreas nativas tradicionalmente empregadas em projetos de recuperação de áreas degradadas. Para confirmar esta hipótese, o objetivo deste trabalho foi de avaliar a interação exótica-nativa e nativa-exótica através de bioensaios com substratos cultivados com espécies exótica e nativas. Os substratos de áreas com monodominância de *U. humidicola* e de mudas das espécies nativas *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) e *Guarea guidonia* (L.) Sleumer, foram peneirados e distribuídos em bandejas plásticas, representando os tratamentos com potencial alelopático. O tratamento controle foi constituído pela adição de carvão ativado (25 mL/L), para inibição de eventual atividade alelopática. Cada bandeja representou uma repetição, e recebeu os substratos tratados ou não com carbono ativado, e sementes de espécies-alvo pré-germinadas *in vitro* ou sem germinação prévia. O experimento foi conduzido sob condições controladas de temperatura (25 °C) e fotoperíodo (12/12 h). Após 35 dias de experimento, os indivíduos foram coletados e mensurados. Os indivíduos de gergelim crescidos sobre o substrato oriundo de pastagem de *U. humidicola* sem carvão ativado apresentaram menores comprimentos que os indivíduos controle, devido principalmente à diminuição do comprimento da raiz dos indivíduos pré-germinados em comparação com o controle. Por outro lado, o mesmo substrato não afetou significativamente indivíduos de *A. colubrina*. O substrato de *A. colubrina* estimulou o alongamento caulinar de indivíduos de *U. humidicola*, ao passo que o substrato de *G. guidonia* não exerceu qualquer interferência sobre a gramínea. Os resultados sugerem que o substrato oriundo da pastagem representou um substrato de *U. humidicola* que inibiu o desenvolvimento inicial do gergelim, corroborando outros trabalhos que avaliaram a atividade alelopática de diferentes espécies do gênero. Apesar da ausência da interferência em *A. colubrina* indicar maior resistência em relação ao gergelim, o efeito estimulatório do substrato de *A. colubrina* sobre *U. humidicola* ressalta a importância de um manejo adequado de áreas invadidas por essa espécie.

Palavras-chave: Alelopatia, *Brachiaria*, Carvão Ativado, *Homeland Security*, *Novel Weapon Hypothesis*.

Introdução

Desde os anos 1960, com a expansão da pecuária, têm sido introduzidas espécies exóticas de gramíneas forrageiras para alimentação do gado. Dentre essas espécies, destacam-se as que compõem o gênero *Urochloa* P. Beauv. (Poaceae), as quais ocupam cerca de 95 milhões de hectares de pastagens do Brasil, e são também abundantes em outras regiões da América Latina (OLIVEIRA *et al.*, 2016). As espécies de *Urochloa* mostraram boa adaptação quando introduzidas nas diferentes fitofisionomias brasileiras devido à alta produção de biomassa e à tolerância a solos pobres (AMBIEL *et al.*, 2008; BERNARDI *et al.*, 2012).

Urochloa humidicola (Rendle) Morrone & Zuloaga, conhecida vulgarmente como “capim-humidícola” ou “quicuio-da-amazônia”, é originária do continente africano, e quando introduzida se adaptou bem a solos pouco drenados e de baixa fertilidade (COSTA *et al.*, 2011; BAO *et al.*, 2015), e resistiu à praga das cigarrinhas-das-pastagens, a qual teria causado danos econômicos sobre outras pastagens (KARIA *et al.*, 2006; CRUZ *et al.*, 2010).

Em espécies exóticas de gramíneas, a presença da via fotossintética C₄ fornece às mesmas uma maior eficiência na fotossíntese em ambientes de altas irradiação solar e temperatura, culminando em maior produção de biomassa (DE FARIA *et al.*, 2015). No geral, apresentam maiores taxas fotossintéticas, maior tolerância ao estresse hídrico, e são mais eficientes no uso dos nutrientes que espécies nativas (WILLIAMS & BARUCH, 2010). Isso se reflete em uma maior vantagem na competição por nutrientes e, conseqüentemente, na dominância dessas espécies exóticas sobre nativas a médio e longo prazo (FERREIRA *et al.*, 2016).

Espécies nativas têm sido indicadas para revegetação com o objetivo de recuperar áreas degradadas, devido ao rápido crescimento e estabelecimento. Algumas dessas espécies nativas podem também apresentar resistência à invasão de plantas exóticas através de efeito alelopático, sendo esse fenômeno denominado de *Homeland Security* (CUMMINGS *et al.*, 2012). As espécies arbóreas *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae) e *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan (Fabaceae) podem ser encontradas em diferentes habitats dentro da Mata Atlântica (MORIM, 2015). *Guarea guidonia* se destaca pelo rápido crescimento e por possuir frutos atrativos para a avifauna, justificando grande valor ambiental (VALLILO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2019). *Anadenanthera colubrina* é considerada fundamental na composição de matas ciliares (MEDEIROS *et al.*, 2016). A capacidade de fixação de N e a alta germinação das

sementes favorecem o uso de *A. colubrina* em sistemas de reflorestamento (SOUCHIE *et al.*, 2005). Contudo, Vieira *et al.* (2019) observaram que a exótica *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A.Rich.) R.Webster afetou o estabelecimento de *A. colubrina* quando cultivadas em conjunto.

Além da vantagem competitiva, espécies gramíneas exóticas podem produzir metabólitos especiais, liberá-los ao ambiente externo, e inibir o estabelecimento das espécies nativas, sendo potencialmente espécies alelopáticas (IAS, 1996). As espécies locais, por não terem contato prévio com essas substâncias exóticas, podem sofrer efeitos negativos no seu desenvolvimento inicial, e esse conceito tem sido denominado como *Novel Weapon Hypothesis* (CALLAWAY & RIDENOUR, 2004). Diferentes espécies de *Urochloa* parecem apresentar esse comportamento. Por exemplo, tanto o solo de pastagens de *U. brizantha*, quanto seus exsudatos radiculares, inibiram a germinação e o desenvolvimento inicial de outras espécies de plantas (MARTINS *et al.*, 2006; SENARATHNE *et al.*, 2010). Estudos semelhantes foram conduzidos com o solo de pastagens de *U. platyphylla* (Munro ex C.Wright) R.D.Webster., com palha de *U. ruziziensis* (R.Germ.& Evrard) Crins. (OLIVEIRA JR *et al.*, 2014), e resíduos de parte aérea de *U. decumbens* (Stapf) R.D.Webster. (ARAÚJO *et al.*, 2018).

A respeito de *U. humidicola*, existem poucos estudos que sugerem a presença de substâncias fitotóxicas em suas raízes e partes aéreas (SOUZA FILHO *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2012; FEITOZA *et al.*, 2018). Além da demonstrada fitotoxidez, sabe-se que as raízes de *U. humidicola* podem produzir micromoléculas inibidoras da nitrificação microbiana, como ácidos fenólicos e lactonas diterpenoídicas, que podem ser liberadas ao solo por exsudação (GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2007; SUBBARAO *et al.*, 2009).

No entanto, até a presente data, não existe informação de que substâncias de *U. humidicola* disponíveis no solo possam diretamente influenciar no desenvolvimento inicial de outras espécies de plantas, incluindo nativas da Mata Atlântica. Essa informação pode subsidiar estudos que buscam compreender os mecanismos invasivos dessa gramínea exótica (THOMAS *et al.*, 2019). Dessa forma, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito dos componentes do solo oriundo de pastagens com monodominância de *U. humidicola* sobre o desenvolvimento inicial de diferentes espécies-alvo. Este estudo também visa avaliar se os substratos de *A. colubrina* e *G. guidonia* afetam o desenvolvimento inicial de *U. humidicola*.

Material e Métodos

Coleta dos substratos

Para o estudo dos potenciais efeitos alelopáticos das plantas de *U. humidicola* e do solo no qual elas crescem, foi realizada a coleta a partir de uma área de pastagem com monodominância de *U. humidicola*. Essa área se encontra no Setor de Caprinocultura do Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ (coordenadas 22° 46' S; 43° 40' W; altitude 33 m). O clima na região é classificado como Aw, *sensu* Koppen (ALVARES *et al.*, 2013), com temperatura média de 23,6 °C e precipitação de 1.192 mm para o ano de 2018 (INMET, 2018). O solo local se trata de um Planossolo A de textura arenosa-argilosa, e não recebe adubos ou corretivos. A pastagem foi introduzida em 1985, e sofre pastejos pouco frequentes de caprinos (BRASIL, 2001; RIBEIRO, 2012). Neste trabalho, foram coletados 24 L de solo a 10,0 cm de profundidade para as etapas posteriores.

Para a avaliação dos potenciais efeitos alelopáticos das espécies nativas florestais *G. guidonia* e *A. colubrina*, 30 mudas das duas espécies foram adquiridas comercialmente a partir de um viveiro de mudas, localizado em Silva Jardim, RJ. As partes vegetais foram descartadas, utilizando-se somente o substrato, com potencial acúmulo de aleloquímicos liberados pelas mudas.

Ensaio em casa de vegetação

Os substratos coletados foram deixados em repouso para secagem à sombra por 24 h e posteriormente peneirados com o auxílio de peneiras com malha de 2,0 mm. Os mesmos foram coletados no total 24 L de substratos oriundos de áreas cultivadas com *U. humidicola*, o qual recebeu adição de areia lavada (proporção 1:1 v/v) com o objetivo de otimizar a drenagem do mesmo, totalizando 48 L de substrato. O volume dos substratos cultivados com *G. guidonia* e *A. colubrina* foi de 24 L cada, e os mesmos não receberam adição da areia. Metade do volume de cada substrato foi separada para constituição do tratamento controle. Para tanto, foi adicionado carvão ativado granulado, na proporção de 25 ml de carvão ativado por um litro de solo, para inibição de eventual atividade alelopática (DEL FABBRO *et al.*, 2014). Tais substratos foram distribuídos em 12 bandejas plásticas para produção de mudas de hortaliças. Cada bandeja possui capacidade de 6 L de substrato, distribuídos em 32 células com 188,5 cm³ de volume cada.

O efeito alelopático do substrato proveniente de área com monodominância de *U. humidicola* foi testado contra sementes de *Sesamum indicum* L. (gergelim), e contra a espécie arbórea *A. colubrina*. As sementes das duas espécies foram submetidas a dois tratamentos antes do transporte para os respectivos substratos: (a) semeadura direta, com o transporte de 64 sementes – 32 por tratamento - diretamente ao substrato, sendo colocada uma semente por célula da bandeja; e (b) pré-germinação em câmara tipo BOD, após 5 dias de incubação a 25 °C e fotoperíodo 12/12h, e posterior transporte de 64 plântulas – 32 por tratamento – para o substrato, sendo uma plântula por célula da bandeja.

Para avaliar o efeito alelopático do substrato cultivado com mudas das espécies nativas *A. colubrina* e *G. guidonia*, sementes de *U. humidicola* foram previamente germinadas em bandejas, utilizando como substrato uma mistura de areia com vermiculita (1:1 v/v). A pré-germinação de *U. humidicola* foi conduzida em casa de vegetação, durante 24 dias.

Após 35 dias de bioensaio, os indivíduos das espécies-alvo foram coletados para mensuração dos comprimentos da raiz e da parte aérea com auxílio de paquímetro digital. O comprimento radicular foi medido desde o colo até o ápice da raiz nas três espécies-alvo. O comprimento da parte aérea foi mensurado desde o colo até o ápice caulinar, nos indivíduos de gergelim e *A. colubrina*, e desde o colo até o ápice da folha superior, nos indivíduos de *U. humidicola*. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do software R 3.6.1v (R CORE TEAM, 2019). A normalidade das amostras foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) (SHAPIRO & WILK, 1965). Para comparação entre os tratamentos nos diferentes parâmetros, adotou-se o teste t de Wilcoxon (WILCOXON, 1945), considerando dados não-paramétricos.

Resultados

O desenvolvimento inicial do gergelim sob efeito do substrato da pastagem de *U. humidicola* está ilustrado nas Figuras 1 e 2. O substrato puro de *U. humidicola* não causou alterações na morfologia externa das raízes principais, na emissão de raízes laterais, e na morfologia externa da parte aérea do gergelim, em comparação aos indivíduos controle (Figura 1). O substrato potencialmente alelopático apresentou efeito sobre o crescimento dos indivíduos de gergelim submetidos à pré-germinação, ou seja, submetidos à germinação prévia em BOD, como sugerem os menores valores de comprimento total em comparação com os indivíduos controle (controle = $77,24 \pm 25,17$ mm; tratamento = $55,76 \pm 23,33$ mm) (Figura 2 A, C). Ao comparar o desenvolvimento de parte aérea e raiz

separadamente, observou-se que o substrato puro reduziu o crescimento da raiz e do caule nos indivíduos pré-germinados, não havendo diferença estatística nos indivíduos que germinaram diretamente sobre o substrato – Semeadura Direta (Figura 2 B, C).

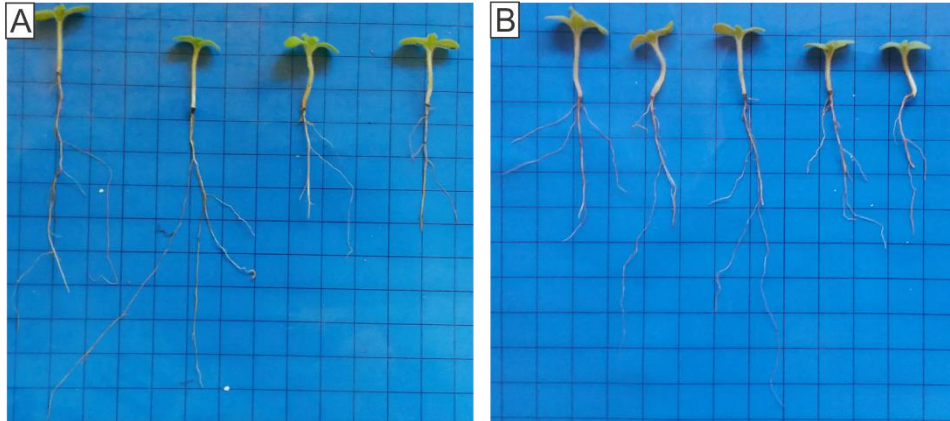


Figura 1. Indivíduos de gergelim após 35 dias de experimento. (A) Indivíduos controle, crescidos sobre substrato obtido de pastagem com monodominância de *Urochloa humidicola*, com acréscimo de carvão ativado. (B) Indivíduos do tratamento com o mesmo substrato, sem carvão ativado. Cada quadrado = 1 cm x 1 cm.

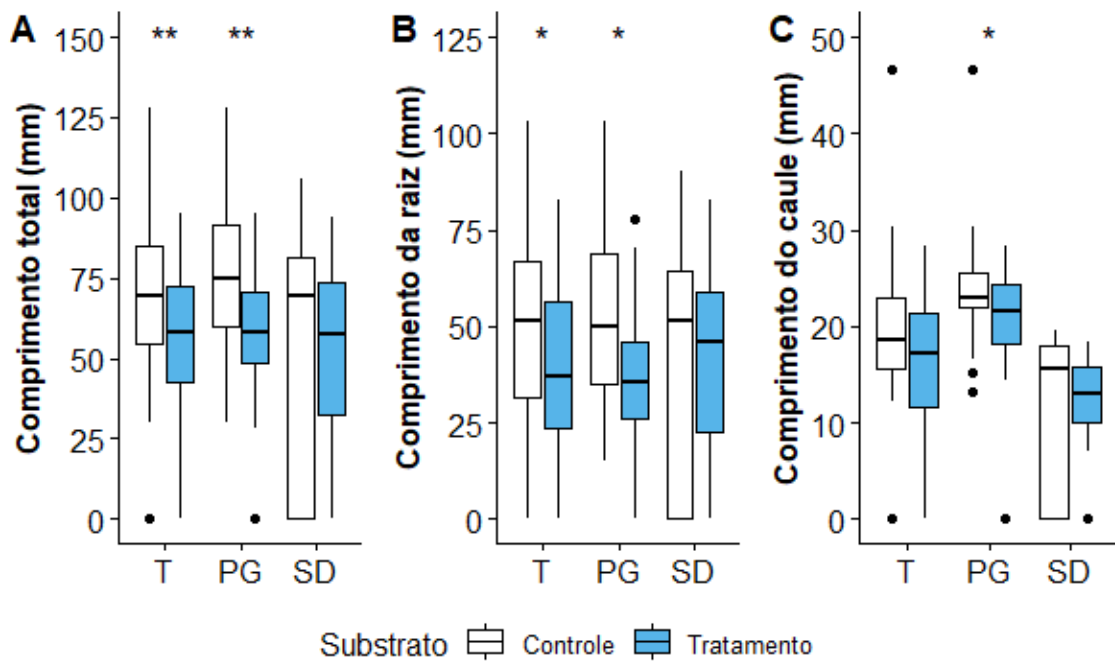


Figura 2. Efeito do substrato de pastagens de *Urochloa humidicola* sobre o desenvolvimento inicial do gergelim (n=32). (A) Comprimento total após cada tratamento. (B) Comprimento da raiz. (C) Comprimento do caule. T = considerando indivíduos Pré-germinados ou de Semeadura Direta; PG = Pré-Germinação; SD = Semeadura Direta. (*) e (**) indicam diferenças significativas após realização do teste t de Wilcoxon ($p < 0,05$ e $0,01$, respectivamente).

O efeito do substrato obtido de pastagens de *U. humidicola* sobre o desenvolvimento inicial da arbórea *A. colubrina* está exposto na Figura 3. Os resultados

indicam que não houve efeito inibitório do substrato puro sobre o crescimento dos indivíduos de *A. colubrina*, sejam esses pré-germinados (controle = $100,13 \pm 69,08$ mm; tratamento = $73,92 \pm 77,40$ mm) ou semeados diretamente (controle = $146,8 \pm 73,50$ mm; tratamento = $113,0 \pm 92,13$ mm).

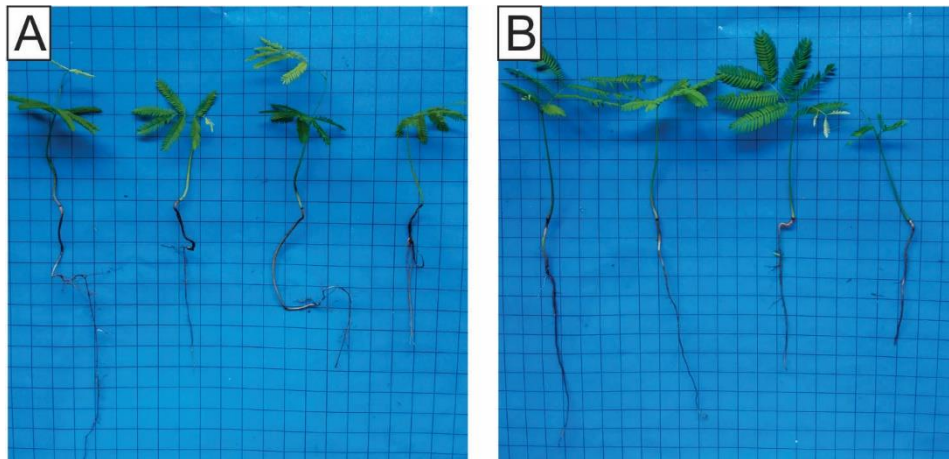


Figura 3. Indivíduos de *Anadenanthera colubrina* após 35 dias de experimento (n=32). (A) Indivíduos controle, crescidos sobre substrato obtido de pastagem com monodominância de *Urochloa humidicola*, com acréscimo de carvão ativado. (B) Indivíduos do tratamento com o mesmo substrato, sem carvão ativado. Cada quadrado = 1 cm x 1 cm.

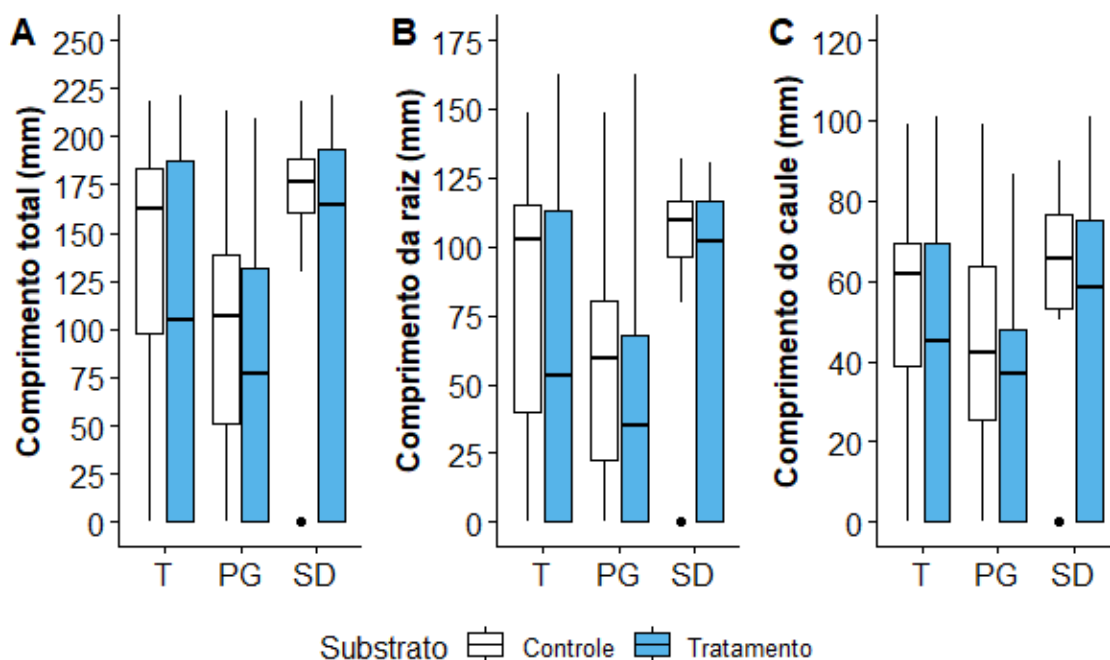


Figura 4. Efeito do substrato de pastagens de *Urochloa humidicola* sobre o desenvolvimento inicial de *Anadenanthera colubrina* após 35 dias de experimento (n=32). (A) Comprimento total após cada tratamento. (B) Comprimento da raiz. (C) Comprimento do caule. T = considerando indivíduos Pré-germinados ou de Semeadura Direta; PG = Pré-Germinação; SD = Semeadura Direta.

Os resultados dos bioensaios com os substratos cultivados anteriormente com espécies nativas sobre o desenvolvimento inicial de *U. humidicola* estão expostos nas Figuras 4 e 5. A respeito dos indivíduos de *U. humidicola* crescidos sobre substratos de *G. guidonia* e *A. colubrina*, não foram observadas diferenças significativas sobre o desenvolvimento das plantas alvo (Figura 5).

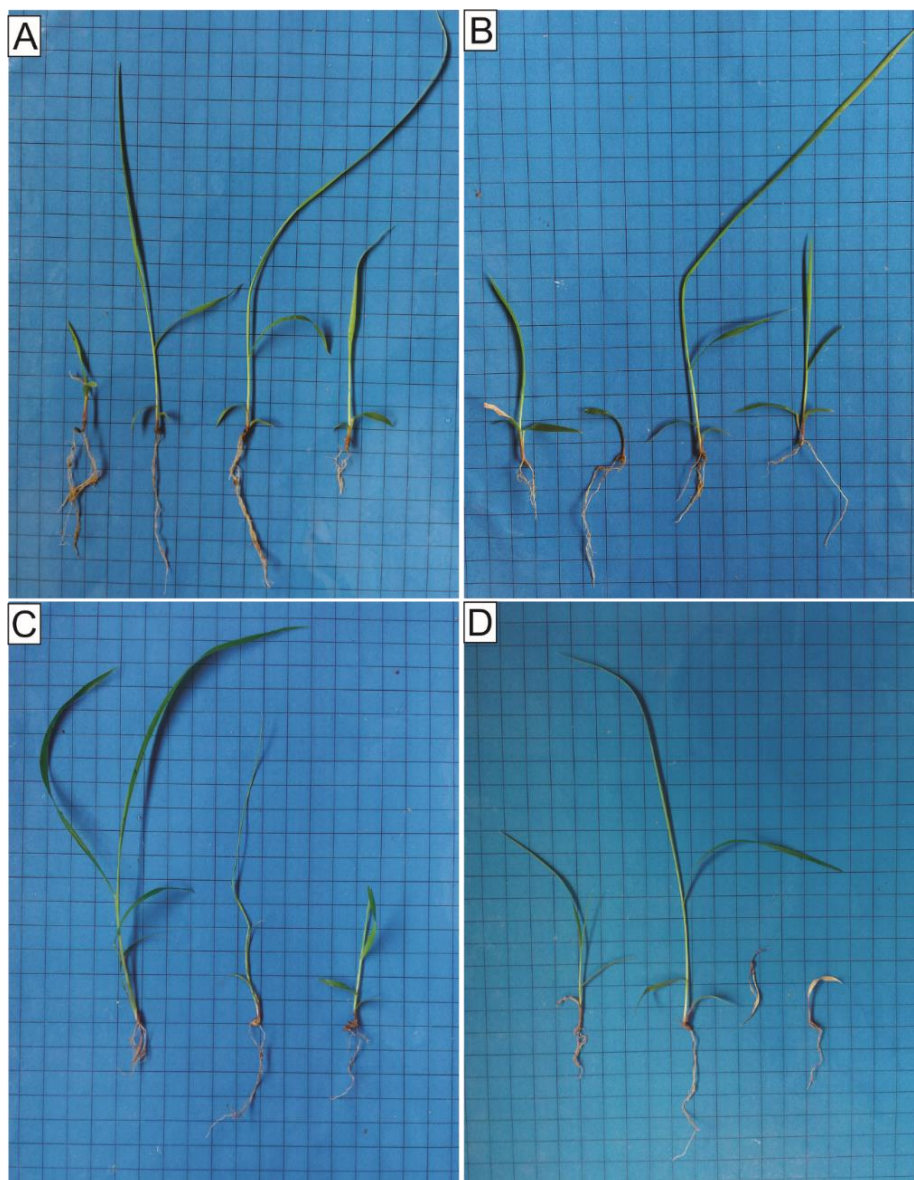


Figura 5. Indivíduos de *Urochloa humidicola* após 35 dias de experimento. (A-B) Bioensaio sobre o substrato obtido de mudas de *Guarea guidonia*, com e sem carvão ativado. (A) Controle (com carvão ativado). (B) Tratamento (sem carvão ativado). (C-D) Bioensaio sobre o substrato obtido de mudas de *Anadenanthera colubrina*, com e sem carvão ativado. (A) Controle (com carvão ativado). (B) Tratamento (sem carvão ativado). Cada quadrado = 1 cm x 1 cm.

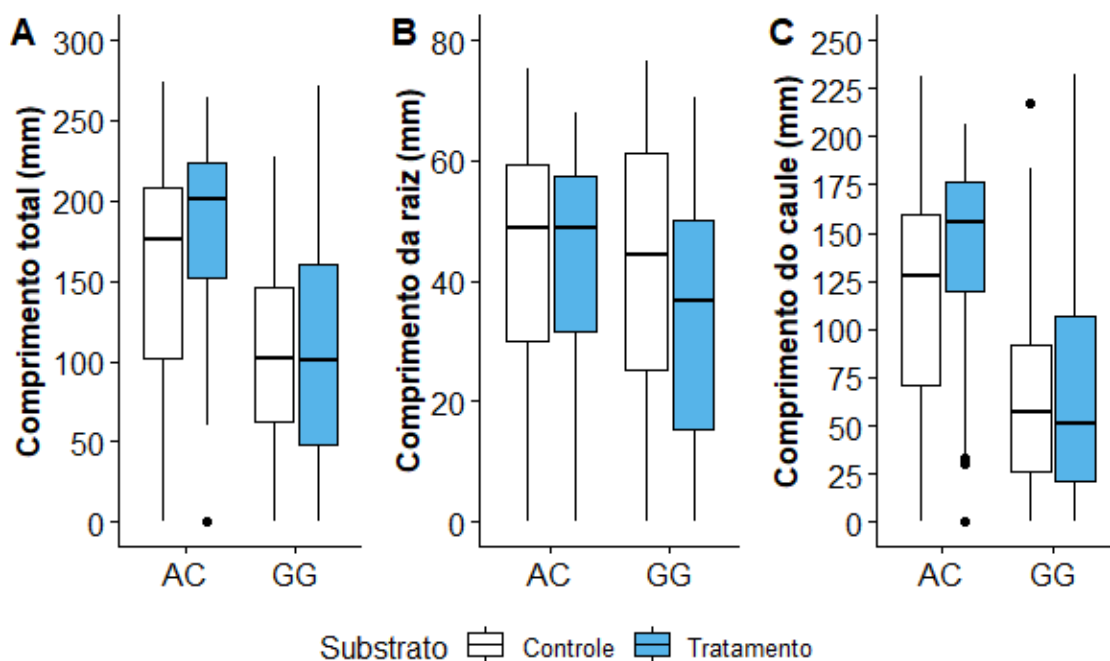


Figura 6. Efeito do substrato obtido de mudas de espécies nativas *Anadenanthera colubrina* e *Guarea guidonia* sobre o desenvolvimento inicial de *Urochloa humidicola* (n=32). (A) Comprimento total após cada tratamento. (B) Comprimento da raiz. (B) Comprimento do caule. AC = *A. colubrina*; GG = *G. guidonia*.

Discussão

Neste estudo, os indivíduos de gergelim sofreram interferência no desenvolvimento inicial quando crescidos sobre os componentes do substrato de pastagens com monodominância de *U. humidicola*, em comparação com indivíduos tratados com o mesmo substrato acrescido de carvão ativado. Este é o primeiro trabalho a avaliar o efeito de substrato cultivado com *U. humidicola* no desenvolvimento inicial de outras espécies vegetais. Os resultados obtidos aqui corroboram trabalhos prévios com outras espécies do gênero *Urochloa*. A solução do solo de *U. brizantha* inibiu a germinação e o alongamento da radícula de *Sida rhombifolia* L. (MARTINS *et al.*, 2006). O próprio solo de *U. brizantha* inibiu a germinação de cinco espécies-alvo em um ensaio *in vitro*: *Raphanus sativus* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Capsicum annum* L., *Crotalaria juncea* L. e *Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob. (SENARATHNE *et al.*, 2010).

As raízes de *U. humidicola* são reconhecidas como produtoras de substâncias fenólicas, como o ácido *p*-cumárico e derivados (GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2007) e saponinas esteroídicas, como a dioscina (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Essas classes de substâncias podem ser liberadas no solo tanto por exsudação radicular, como por

decomposição vegetal (OLESZEK, 1993; GAJI *et al.*, 2012). Estudos com exsudatos de *U. humidicola* identificaram o diterpenoide brachialactona, o qual está relacionado com a inibição da nitrificação biológica (SUBBARAO *et al.*, 2009). Bioensaios em laboratório evidenciaram o potencial fitotóxico dessas classes de substâncias (SOUZA FILHO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2017; FEITOZA *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2018). Os menores comprimentos caulinar e radicular dos indivíduos de gergelim sugerem um desenvolvimento inibido pelo substrato, possivelmente devido a substâncias produzidas e liberadas por *U. humidicola*.

Em bioensaios alelopáticos que utilizam o solo como substrato, é comum o emprego do carvão ativado, pois o mesmo apresenta sua capacidade de adsorver moléculas orgânicas do solo, o que faria reduzir o efeito de possíveis aleloquímicos liberados na rizosfera (MURRELL *et al.*, 2011; NOLAN *et al.*, 2015). Autores consideram que possíveis efeitos colaterais causados pelo carvão ativado são residuais e interferem muito pouco nos bioensaios (DEL FABBRO *et al.*, 2014). O carvão ativado comprovadamente reduziu os teores da batatasina-III, produzida por *Empetrum hermaphroditum* Hagerup (NILSSON *et al.*, 2000), e do *trans-resveratrol*, liberado por *Reynoutria japonica* Houtt. (ABGRALL *et al.*, 2018). É possível que o carvão ativado tenha reduzido os teores dos aleloquímicos produzidos e liberados pelas raízes de *U. humidicola* no substrato controle, culminando nos maiores valores de comprimento caulinar e radicular observados após esse tratamento.

Neste estudo, os indivíduos de *A. colubrina* não foram significativamente inibidos pelo substrato de pastagens com monodominância de *U. humidicola*. Um resultado semelhante foi relatado por Uddin *et al.* (2014), que não observaram diferenças significativas entre os tratamentos com carvão e sem carvão, tanto na presença como na ausência de *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steud. Nesse caso, os autores admitem que a proporção de carvão ativado tenha sido insuficiente para remover os aleloquímicos disponíveis no solo. De fato, Uddin *et al.* (2014) utilizaram uma proporção inferior de carvão ativado por substrato (40 mL/L), ao passo que nosso estudo utilizou uma proporção de 50 mL/L. Segundo Vieira *et al.* (2019), a inibição do crescimento de *A. colubrina* quando cultivada junto a indivíduos de *U. brizantha* se deve mais pelo efeito da gramínea exótica sobre a disponibilidade de água, o que causou estresse oxidativo e menor eficiência fotossintética na espécie arbórea. Esses autores atribuíram os resultados observados à maior eficiência competitiva de *U. brizantha*, e desconsideraram a possibilidade de efeito alelopático.

As espécies *A. colubrina* e *G. guidonia*, que podem ser encontradas em diferentes fitofisionomias da Mata Atlântica, são frequentemente indicadas para plantio em programas de restauração ambiental (VALLILO *et al.*, 2002; MORIM, 2015; MOTA *et al.*, 2017). Existem poucos estudos fitoquímicos com as raízes das duas espécies arbóreas. Nas partes aéreas de *G. guidonia*, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos são frequentes (GARCEZ *et al.*, 1998; LAGO *et al.*, 2002; BROCHINI *et al.*, 2009), ao passo que suas raízes apresentam atividade inseticida (COELHO *et al.*, 2006). A espécie *A. colubrina* é reconhecida pela ampla distribuição de taninos no corpo da planta (PAES *et al.*, 2010; PEDONE-BONFIM *et al.*, 2013). Este trabalho buscou avaliar se os metabólitos especiais das duas espécies, quando disponíveis no substrato, afetam o desenvolvimento de *U. humidicola*, dentro do contexto da *Homeland Security*. Os resultados obtidos sugerem que os substratos de ambas as mudas, sem adição de carvão ativado, não afetaram o crescimento de *U. humidicola* ao final do bioensaio, em comparação com os indivíduos crescidos no mesmo substrato com carvão. Possivelmente, o carvão ativado diminuiu o teor das micromoléculas responsáveis pela comunicação planta-microrganismo na rizosfera, o que pode ter afetado o estabelecimento de micorrizas arbusculares nas raízes de *U. humidicola* (WEISSHUHN & PRATI, 2009; TEUTSCHEROVA *et al.*, 2019), e conseqüentemente reduzido o crescimento dos indivíduos controle de *U. humidicola* em comparação com os crescidos sobre substrato sem carvão ativado. Considerando que o efeito alelopático pode ser variável entre espécies nativas (CUMMINGS *et al.*, 2012), estudos que avaliem a resistência de comunidades locais à invasão de espécies exóticas necessitam de uma amostragem mais ampla de espécies nativas de potencial alelopático.

Em resumo, o substrato de pastagens com monodominância de *U. humidicola* afetou negativamente o desenvolvimento inicial do gergelim, indicando que as substâncias produzidas pela gramínea podem ter potencial alelopático. Esses resultados são uma evidência à *Novel Weapon Hypothesis*, indicando que o efeito inibitório dos componentes de substrato obtido de pastagens de *U. humidicola* pode atuar como facilitador do processo invasivo dessas gramíneas exóticas nas diferentes fitofisionomias brasileiras. O substrato cultivado com as espécies nativas *A. colubrina* e *G. guidonia* não teve efeito inibitório sobre *U. humidicola*, sugerindo boa aclimação da exótica no novo ambiente. Os resultados aqui expostos ressaltam a importância do manejo adequado das áreas ocupadas por *U. humidicola* para o maior sucesso nos programas de restauração ambiental.

Referências Bibliográficas

- ABGRALL, C.; FOREY, E.; MIGNOT, L.; CHAUVAT, M. Invasion by *Fallopia japonica* alters soil food webs through secondary metabolites. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 127, p. 100–109, 2018.
- ALVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C.; DE MORAES GONÇALVES, J. L.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.
- AMBIEL, A.C.; GUABERTO, L.M.; VANDERLEI, T.M.; NETO, N.B.M. Agrupamento de acessos e cultivares de três espécies de *Brachiaria* por RAPD. *Acta Scientiarum - Agronomy*, v. 30, n. 4, p. 457–464, 2008.
- ARAÚJO, A.C.F.; MADALÃO, J.C.; JAKELAITIS, A.; COSTA, A.C.; ALMEIDA, G.M. Residues of forage species affect photosynthetic characteristics of the pequiheiro. *Revista Caatinga*, v. 31, n. 1, p. 9–18, 2018.
- BAO, F.; ASSIS, M.A.; ARRUDA, R.; POTT, A. Effects of *Urochloa humidicola* on plant diversity in native grasslands in a neotropical wetland. *Wetlands*, v. 35, n. 5, p. 841–850, 2015.
- BERNARDI, A.C.C.; OLIVEIRA, P.P.A.; PRIMAVESI, O. Soil fertility of tropical intensively managed forage system for grazing cattle in Brazil. In: WHALEN, J. (Ed.). *Soil Fertility Improvement and Integrated Nutrient Management - A Global Perspective*. Rijeka: InTech, 2012. p. 37–56.
- BRASIL, F.C. *Estudo de características morfológicas radiculares de uma pastagem de Brachiaria humidicola com auxílio de análise digital de imagens*. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2001. 136 f.
- BROCHINI, C.B.; ROQUE, N.F.; LAGO, J.H.G. Minor sesquiterpenes from the volatile oil from leaves of *Guarea guidonia* Sleumer (Meliaceae). *Natural Product Research*, v. 23, n. 17, p. 1615–1620, 2009.
- CALLAWAY, R.M.; RIDENOUR, W.M. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Frontiers in Ecology and the Environment*, v. 2, n. 8, p. 436–443, 2004.
- COELHO, A.A.M.; PAULA, J.E.; ESPÍNDOLA, L.S. Insecticidal activity of cerrado plant extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. *Neotropical Entomology*, v. 35, n. 1, p. 133–138, 2006.

- COSTA, C.J.; DE ARAÚJO, R.B.; BÔAS, H.D.C.V. Tratamentos para a superação de dormência em sementes de *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. *Pesquisa Agropecuaria Tropical*, v. 41, n. 4, p. 519–524, 2011.
- CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M.L.C.; GONTIJO NETO, M.M.; SILVA, R.B. *Danos da Cigarrinha-das-Pastagens, Deois flavopicta Stal (Homoptera: Cercopidae) em milho consorciado com Braquiárias*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 10f.
- CUMMINGS, J.A.; PARKER, I.M.; GILBERT, G.S. Allelopathy: a tool for weed management in forest restoration. *Plant Ecology*, v. 213, n. 12, p. 1975–1989, 2012.
- DE FARIA, A.P.; FERNANDES, G.W.; FRANÇA, M.G.C. Physiological approaches to determine the impact of climate changes on invasive African grasses in the savanna ecoregion of Brazil. *Environmental Earth Sciences*, v. 74, n. 4, p. 3077–3088, 2015.
- DEL FABBRO, C.; GÜSEWELL, S.; PRATI, D. Allelopathic effects of three plant invaders on germination of native species: A field study. *Biological Invasions*, v. 16, n. 5, p. 1035–1042, 2014.
- FEITOZA, R.B.B.; LIMA, H.R.P.; OLIVEIRA, E.A.G.; OLIVEIRA, D.R.; MORAES, L.F.D.; OLIVEIRA, A.E.A.; CARVALHO, M.G.; DA CUNHA, M. Structural and ultrastructural variations in roots of *Calopogonium mucunoides* Desv. treated with phenolic compounds from *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga and phenolic commercial standards. *South African Journal of Botany*, v. 116, p. 142–149, 2018.
- FERREIRA, L.V.; PAROLIN, P.; MATOS, D.C.L.; CUNHA, D.A.; CHAVES, P.P.; NECKEL, S.O. The effect of exotic grass *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster (Poaceae) in the reduction of species richness and change of floristic composition of natural regeneration in the Floresta Nacional de Carajás, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 88, p. 589–597, 2016.
- GAJI, G.; KOSTI, O.; PAVLOVI, M.; MITROVI, M. Seasonal dynamics of allelopathically significant phenolic compounds in globally successful invader *Conyza canadensis* L. plants and associated sandy soil. v. 207, p. 812–820, 2012.
- GARCEZ, F.; NÚÑEZ, C.; GARCEZ, W.; ALMEIDA, R.; ROQUE, N. Sesquiterpenes, limonoid and coumarin from the wood bark of *Guarea guidonia*. *Planta Medica*, v. 64, n. 1, p. 79–80, 1998.
- GOPALAKRISHNAN, S.; SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; YOSHIHASHI, T.; ITO, O.; MAEDA, I.; ONO, H.; YOSHIDA, M. Nitrification inhibitors from the

- root tissues of *Brachiaria humidicola*, a tropical grass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 1385–1388, 2007.
- IAS - INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY. *Constitution and bylaw of IAS*. Cádiz: IAS Newsletter, 1996.
- INMET. Rede de Estações Climatológicas. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/index>>.
- KARIA, C.T.; DUARTE, J.B.; ARAÚJO, A.C.G. *Cultivares do gênero Brachiaria (Trin.) Griseb. no Brasil*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2006. 58p.
- LAGO, J.H.G.; BROCHINI, C.B.; ROQUE, N.F. Terpenoids from *Guarea guidonia*. *Phytochemistry*, v. 60, n. 4, p. 333–338, 2002.
- MARTINS, D.; MARTINS, C.C.; COSTA, N.V. Potencial alelopático de soluções de solo cultivado com *Brachiaria brizantha*: efeitos sobre a germinação de gramíneas forrageiras e plantas daninhas de pastagens. *Planta Daninha*, v. 24, n. 1, p. 61–70, 2006.
- MEDEIROS, R.L.S.; SOUZA, V.C.; BARBOSA NETO, M.A.; ARAÚJO, L.; BARBOSA, A.D.S.; MEDEIROS, R.L.S. Estrutura da regeneração natural de *Anadenanthera colubrina* em fragmento de brejo de altitude em Bananeiras, PB. *Pesquisa Florestal Brasileira*, v. 36, n. 86, p. 95, 2016.
- MORIM, M. P. *Anadenanthera in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB18071>>. Acesso em: 31 jul. 2019.
- MOTA, G.S.; SARTORI, C.J.; MIRANDA, I.; QUILHÓ, T.; MORI, F.A.; PEREIRA, H. Bark anatomy, chemical composition and ethanol-water extract composition of *Anadenanthera peregrina* and *Anadenanthera colubrina*. *PLoS ONE*, v. 12, n. 12, e0189263, 2017.
- MURRELL, C.; GERBER, E.; KREBS, C.; PAREPA, M.; SCHAFFNER, U.; BOSSDORF, O. Invasive knotweed affects native plants through allelopathy. *American Journal of Botany*, v. 98, n. 1, p. 38–43, 2011.
- NILSSON, M.C.; ZACKRISSON, O.; STERNER, O.; WALLSTEDT, A. Characterisation of the differential interference effects of two boreal dwarf shrub species. *Oecologia*, v. 123, n. 1, p. 122–128, 2000.
- NOLAN, N.E.; KULMATISKI, A.; BEARD, K.H.; NORTON, J.M. Activated carbon decreases invasive plant growth by mediating plant–microbe interactions. *AoB Plants*, v. 7, plu072, 2015.

- OLESZEK, W. Allelopathic potentials of alfalfa (*Medicago sativa*) saponins: Their relation to antifungal and hemolytic activities. *Journal of Chemical Ecology*, v. 19, n. 6, p. 1063–1074, 1993.
- OLIVEIRA, A.P.P.; PEREIRA, S.R.; CÂNDIDO, A.C.S.; LAURA, V.A.; PERES, M. T.L.P. Can allelopathic grasses limit seed germination and seedling growth of Mutambo? A test with two species of *Brachiaria* grasses. *Planta Daninha*, v. 34, n. 4, p. 639–648, 2016.
- OLIVEIRA, D.R.; NEPOMUCENO, D.D.; CASTRO, R. N.; BRAZ FILHO, R.; DE CARVALHO, M.G. Special metabolites isolated from *Urochloa humidicola* (Poaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, n. 2, p. 789–797, 2017.
- OLIVEIRA JR, R.S.; RIOS, F.A.; CONSTANTIN, J.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; GEMELLI, A.; MARTINI, P.E. Grass straw mulching to suppress emergence and early growth of weeds. *Planta Daninha*, v. 32, n. 1, p. 11–17, 2014.
- PAES, J.B.; SANTANA, G.M.; DE AZEVEDO, T.K.B.; DE MORAIS, R.M.; CALIXTO, J.T. Substâncias tânicas presentes em várias partes da árvore angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Veil.) Brenan. var. cebil (Gris.) Alts.). *Scientia Forestalis/Forest Sciences*, n. 87, p. 441–447, 2010.
- PEDONE-BONFIM, M.V.; LINS, M.A.; COELHO, I.R.; SANTANA, A.S.; SILVA, F. S.; MAIA, L.C. Mycorrhizal technology and phosphorus in the production of primary and secondary metabolites in cebil (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) seedlings. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, n. 6, p. 1479–1484, 2013.
- RIBEIRO, R.C. *Considerações sobre a química de Brachiaria humidicola e efeitos alelopáticos sobre leguminosas tropicais*. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2012. 122f.
- RIBEIRO, R.C.; DE CARVALHO, M.G.; LOPES, H.M.; ROSSIELLO, R.O.P.; BARBIERI JUNIOR, E. allelopathic activity of the hydrolate and water decoction of *Brachiaria humidicola* (Rendle) plant parts on the germination of four tropical leguminous species. *ISRN Agronomy*, v. 2012, p. 1–6, 2012.
- SENARATHNE, S.H.S.; DISSANAYAKA, D.N.M.; VIDHANA ARACHCHI, L.P. Allelopathic potential of *Brachiaria brizantha* and *B. milliformis* on seed germination of selected bioassay species. *Pakistan Journal of Weed Science Research*, v. 16, n. 2, p. 207–216, 2010.
- SILVA, B.F.; HENRIQUE, I.; AZEVEDO, F.; MAYHÉ-NUNES, A.; BREIER, T.;

- FREITAS, A.F.N. Ants promote germination of the tree *Guarea guidonia* by cleaning its seeds. *Floresta e Ambiente*, v. 26, n. 3, p. e20180151, 2019.
- SOUCHIE, E.L.; FRANCA, E.; CAMPELLO, C.; MARIA, E.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J. Arborização de pastagem na região da Mata Atlântica. *Floresta e Ambiente*, v. 12, n. 2, p. 22–27, 2005.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; PEREIRA, A.A.G.; BAYMA, J.C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. *Planta Daninha*, v. 23, n. 1, p. 25–32, 2005.
- SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M.P.; ONO, H.; MORETA, D.E.; SALCEDO, A.F.; YOSHIHASHI, A.T.; ISHIKAWA, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I. M.; LASCANO, C.E.; BERRY, W.L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 41, p. 17302–17307, 2009.
- TEUTSCHEROVA, N.; VAZQUEZ, E.; AREVALO, A.; PULLEMAN, M.; RAO, I.; ARANGO, J. Differences in arbuscular mycorrhizal colonization and P acquisition between genotypes of the tropical *Brachiaria* grasses: is there a relation with BNI activity? *Biology and Fertility of Soils*, v. 55, n. 4, p. 325–337, 2019.
- THOMAS, P.A.; SCHÜLER, J.; BOAVISTA, L.R.; TORCHELSEN, F.P.; OVERBECK, G.E.; MÜLLER, S.C. Controlling the invader *Urochloa decumbens*: Subsidies for ecological restoration in subtropical Campos grassland. *Applied Vegetation Science*, v. 22, n. 1, p. 96–104, 2019.
- UDDIN, N.; ROBINSON, R.W.; CARIDI, D.; AL HARUN, A.Y. Suppression of native *Melaleuca ericifolia* by the invasive *Phragmites australis* through allelopathic root exudates. *American Journal of Botany*, v. 101, n. 3, p. 479–487, 2014.
- VALLILO, M.I.; PASTORE, J.A.; FLORSHEIM, S.M.B.; NAKAOKA SAKITA, M. Descrição botânica, anatomia foliar e composição química do solo e das folhas de *Guarea guidonia* (L.) Sleumer. *Revista Instituto Florestal*, v. 14, n. 2, p. 85–94, 2002.
- VIEIRA, E.A.; ANDRADE GALVÃO, F.C.; BARROS, A.L. Influence of water limitation on the competitive interaction between two Cerrado species and the invasive grass *Brachiaria brizantha* cv. Piatã. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 135, n. August 2018, p. 206–214, 2019.
- WEISSHUHN, K.; PRATI, D. Activated carbon may have undesired side effects for

testing allelopathy in invasive plants. *Basic and Applied Ecology*, v. 10, n. 6, p. 500–507, 2009.

WILLIAMS, D. G.; BARUCH, Z. african grass invasion in the Americas: Ecosystem consequences and the role of ecophysiology. *Biological Invasions*, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2010.

ZHAO, M.; CHENG, J.; GUO, B.; DUAN, J.; CHE, C. Momilactone and related diterpenoids as potential agricultural chemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, n. 30, p. 7859–7872, 2018.

CAPÍTULO 2

(Este capítulo foi submetido à revista Journal of Agricultural and Food Chemistry)

Evaluation of phytotoxicity of *Urochloa humidicola* roots by bioassays and microscopic analysis. Characterization of new compounds

Rodrigo Barbosa Braga Feitoza[†], Rosa M. Varela[#], Ascensión Torres[#], José M. G. Molinillo[#], Helena Regina Pinto Lima[‡], Luiz Fernando Duarte de Moraes[§], Maura Da Cunha[†], Francisco A. Macías^{#,}*

[†] Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 28013-602, Campos dos Goytacazes, Brazil.

[‡] Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23897-000, Seropédica, Brazil.

[§] EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, 23891-000, Seropédica, Brazil.

[#] Grupo de Alelopatía, Departamento de Química Orgánica, Instituto de Biomoléculas (INBIO), Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, C/ República Saharaui, n 7, 11510-Puerto Real (Cádiz), Spain

Abstract

Herbicides are a key element in agriculture, although, sometimes, can generate environmental problems. Natural alternatives are being sought. Thus, invasive plants could be a source not yet explored for the development of future herbicides. The first step would be to know the phytotoxic activity, especially of important weeds. *Urochloa humidicola* presents high invasive potential at Brazilian environments since they hamper the establishment of other plants. This work aims to evaluate the phytotoxicity of *Urochloa humidicola* root extracts and to elucidate its major compounds. Extracts phytotoxicity was tested on wheat coleoptile assay, on seeds of distinct target species, including *Anadenanthera colubrina* and troublesome weeds. The ethyl acetate extract was the most active one on wheat coleoptile. The most affected weeds were *Echinochloa crus-galli*, *Megathyrus maximus* and *Amaranthus viridis*, the last one with 90% inhibition at 400 ppm, higher than that of the herbicide Logran[®]. Microscopic and ultrastructural analysis in *A. colubrina* roots point to possible signals of cell death. From the extract, seven compounds were identified, where one diterpene and four saponins are new. The phytotoxicity activity of *U. humidicola* justify the observed issues in ecological restoration with *A. colubrina* in presence of *Urochloa* species, and its effect on weeds reinforce its potential use in agriculture.

Keywords: *Brachiaria*, ultrastructure, weeds, saponins, brachialactol.

Introduction

Agriculture is a cornerstone of the global food supply. Increased demand for food requires a steady increase in agricultural productivity. Herbicides are a key part of any strategy attempt to increase production. Despite its usefulness, herbicides can also cause problems for human health, the environment and the agricultural sector, by implanting resistant species. In this situation, the agricultural market is demanding research into the development of new herbicides based on natural resources. In this sense, plants have developed defense mechanisms against their aggressors and competitors that humans can use for their benefit in agriculture and other fields.

Invasive plants deserve special interest at this point. Its prevalence capacity is a problem when introduced in natural environments. The study of these plants, from the agricultural point of view, would explore its potential as a source for the development of future herbicides. To do this, a first step would be to assess their phytotoxic activity, especially on troublesome weeds in agriculture. In Brazil, distinct pasture species have been introduced aiming cattle feeding since the second half of 21th Century. Around 95 million hectares are estimated to be occupied by *Urochloa* P. Beauv. (Poaceae) species (OLIVEIRA *et al.*, 2016). *Urochloa* (syn. *Brachiaria* (Trin.) Griseb.) forage species were successfully established due to their high adaptability to poor, acid and humid soils (BERNARDI *et al.*, 2012). *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga (syn. *Brachiaria humidicola*) is one of the most used species in Brazilian pastures due to its high adaptability to clay soils and high tolerance to *Deois flavopicta* (Hemiptera: Cercopidae) parasitism (SOUZA *et al.*, 2016). Also, *U. humidicola* shows tolerance to flooded sites due to its high production of adventitious roots (BAO *et al.*, 2015). As *Urochloa* species are introduced to a new environment, they present competitive advantages in relation to native species. In general, domination may be due to their faster growth, higher photosynthetic rates through C₄ pathway, higher adaptability to nutrient-poor soils, and high seed production (RIBEIRO *et al.*, 2012; DE FARIA *et al.*, 2015). In this sense, *Urochloa* species tend to act as invader species, and to exert domination on native species. In this scenario, either biodiversity at local phytophysiologicals or agricultural productivity may be negatively affected (SOUZA-ALONSO *et al.*, 2017; YUAN *et al.*, 2018).

In *Urochloa* species both roots and leaves are recognized as important sources of secondary metabolites, including terpenoids, saponins, hydroxycinnamic acids and flavonoids (SOUZA FILHO *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

When these molecules are released to the environment, they may affect the establishment of other living organisms and cause an allelopathic interaction (IAS, 1996). Metabolites acting in this interaction are named as allelopathic compounds or allelochemicals. The allelopathic effect of these exotic species may promote establishment and dominance of exotic species, which effectively turns them into invasive species (CALLAWAY & RIDENOUR, 2004). In this sense, phytotoxic activities were described and possible allelochemicals were identified for *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D.Webster (SANTOS *et al.*, 2008), *U. decumbens* (Stapf) R.D.Webster (OLIVEIRA *et al.*, 2016; DA SILVA, L.M.I. *et al.*, 2017) and *U. ruzizensis* (R.Germ. & Evrard) Crins (NEPOMUCENO *et al.*, 2017). Until this date, there are few allelopathic or chemical studies regarding *U. humidicola* in comparison to other *Urochloa* species. Distinct secondary metabolites are produced by *U. humidicola*, such as saponins, flavones, flavonols and phenolic acids (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Ribeiro *et al.* (2012) observed hydrolate and water decoction of different *U. humidicola* parts inhibited germination of a number of legume species, which suggests the presence of phytotoxic compounds in this species. From *U. humidicola* leaves, Souza Filho *et al.* (2005) isolated *p*-coumaric acid, and this compound inhibited seed germination of lettuce.

Previous works from our group investigated the effect of phytotoxic compound from *U. humidicola* aerial parts on the legume *Calopogonium mucunoides* Desv. *Trans*-cinnamic acid and the flavonoids quercetin, rutin and quercetin-3- α -rhamnoside markedly inhibited *C. mucunoides* initial development and caused changes in xylem cell elements (RIBEIRO *et al.*, 2015). The hydromethanolic extract of *U. humidicola* aerial parts inhibited *C. mucunoides* root growth, and led to degradation of cell nucleus, whereas *p*-coumaric acid affected both mitochondrial cristae and nucleus (FEITOZA *et al.*, 2018). However, most phytochemical and allelopathic studies were conducted using *U. humidicola* aerial parts, ignoring roots as a potential producer of secondary metabolites (BAO *et al.*, 2015), and as an interaction mediator between the plant and the soil (WANG *et al.*, 2016). Also, bioguided screening of *U. humidicola* roots may assist studies on weed management by indicating possible phytotoxic compounds.

There is a high demand on native plant species for recovery of degraded areas. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Fabaceae), commonly known as angico, has been adopted due to its distribution in diverse biomes (MOTA *et al.*, 2017), high seed production and germination percentage (BISPO *et al.*, 2017). However, the use of tree

native species for restoration at distinct biomes has been problematic since invader grasses dominate (VIEIRA *et al.*, 2019), as in the case of *U. humidicola*.

Thus, this study aimed to evaluate the phytotoxic effect of compounds from *U. humidicola* roots on germination and initial development of different target species. Changes on anatomy and ultrastructure of *A. colubrina* roots were also described. Lastly, major secondary compounds were characterized and identified from *U. humidicola* roots using bioguided procedures.

Material and Methods

General Experimental Procedures. Infrared (IR) spectra (KBr) were recorded using a Fourier transformed infrared (FT-IR) spectrum 1000 spectrophotometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra were obtained from 400 and 500 MHz spectrometers (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Chemical shifts are shown in ppm and were calibrated using as reference residual signals of solvents CHCl₃-d₁ (1H = δ 7.25; 13C = δ 77.00) and CH₃OH-d₁ (1H = δ 3.30; 13C = δ 49.05). Optical rotations were determined using a model 241 polarimeter (PerkinElmer, Waltham, MA, USA), at room temperature and sodium D line. An ultrasonic bath (360 W, JP Selecta, Barcelona, Spain) was used for extraction. Column chromatography (CC) was carried out on silica gel (Acros Organics, Geel, Belgium). Aluminium sheets coated with silica gel 60 F254 or 60 RP-18 F254S (Merck, Darmstadt, Germany) were used for thin-layer chromatography (TLC). In TLC, compounds were revealed with Oleum (H₂SO₄:H₂O:acetic acid 1:4:20 v/v) and heated at 150 °C. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was conducted using Merck Hitachi D-7000 software (Tokyo, Japan), Elite LaChrom RI L-2490 detection channels, and LaChrom L-2130 four-channel pumps, with flow rates of 1 mL/min for analytical columns and 3 mL/min for semipreparative columns. The HPLC used columns were an analytical reversed phase Phenomenex Synergi RP-80A (Torrance, CA, USA), a semipreparative reversed phase LiChrospher RP-18 (Merck), and a semipreparative normal phase LiChrospher Si 60 (Merck) columns.

Organic solvents. Acetone, ethyl acetate, chloroform, dichloromethane, methanol and *n*-hexane (VWR International, Radnor, PA, USA) were used for extraction, column chromatography, TLC and HPLC procedures. Chloroform and methanol with a deuteration minimum degree of 99.95% for NMR spectroscopy were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Study area and plant material. Roots of *U. humidicola* at vegetative state were collected in a *U. humidicola* monodominant pasture area, at the Goat Sector of the Animal Science Institute in Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil (coordinates 22° 46' S; 43° 40' W; altitude 33 m). Exsicates of *U. humidicola* were deposited in the RBR Herbarium (N° 46249). Local climate is classified as Aw sensu Köppen (ALVARES *et al.*, 2013), with an annual mean temperature of 23.8 °C and total precipitation of 1192 mm during the year 2018 (INMET, 2018). The pasture was introduced in 1985, and presents a sandy/clay Planosol A soil without any fertilizers or corrections.

Seeds of wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Catervo), lettuce (*Lactuca sativa* L.), onion (*Allium cepa* L.), tomato (*Solanum lycopersicum* L.), and watercress (*Lepidium sativum* L.) were provided from FITÓ (Barcelona, Spain). Seeds of *Amaranthus viridis* L., *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster and *Megathyrsus maximus* (Pilg.) B.K.Simon & S.W.L.Jacobs were purchased from Agro Cosmos (Engenheiro Coelho, Brazil). *Echinochloa cruz-galli* (L.) Beauv., *Lolium perenne* L. and *Lolium rigidum* Gaudin seeds were purchased from Herbiseed (Reading, UK). Seeds of *A. colubrina* were collected from individuals at the Poço das Antas Biological Reserve, located in Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brazil (coordinates 22° 32' S; 42° 16' W; altitude 14-205 m).

Extraction and isolation. Roots were dried using a forced air oven at 50 °C until constant weight, and grounded using a cyclone mill (TECNAL TE-625, Piracicaba, Brazil) until a powder is obtained (2.23 kg). An initial extraction using 400 g of root powder was conducted by maceration using distilled water as solvent (1:10 m/v), for 24 h in dark at room temperature. The root crude aqueous extract (**RCA**) was freeze-dried (Liotop K105, São Carlos, Brazil) to obtain 5.6 g of **RCA**. A small portion (50 mg) was resuspended in distilled water for liquid-liquid extraction with ethyl acetate (1:1 v/v). Two root fractions – ethyl acetate (**REA** = 10.2 mg) and distilled water (**RAF** = 33.4 mg) – were recovered.

A second extraction was conducted with 20 g of root powder and 200 mL of *n*-hexane to remove lipid compounds. Next, the defatted residue was recovered and divided into two equal parts. One portion was extracted sequentially with acetone (**RAc** = 68.9 mg) and methanol (**RMS** = 233.0 mg). The remaining material was extracted with methanol only (**RMe** = 205.9 mg). All extractions were conducted using an ultrasonic bath during three cycles of 15 min for each solvent (DA SILVA, B.P. *et al.*, 2017).

All extracts were dried with a rotary evaporator, and stocked for analysis and bioassays. Among the tested extracts, REA was the most bioactive. Thus, 1.83 kg of root powder was extracted with distilled water using an ultrasound bath during 15 min, and this procedure was repeated two times. The obtained aqueous crude extract was submitted to liquid-liquid extraction with ethyl acetate (1:1 v/v) to obtain 5.8 g of **REA**. The **REA** extract was fractioned by reversed phase column chromatography, using RP-18 silica as stationary phase, and crescent solutions of methanol in distilled water (0-100%) as mobile phase (DA SILVA, B.P. *et al.*, 2017). From this column the following fractions were recovered and dried: dH₂O (1755.6 mg), 20% MeOH (94.8 mg), 40% MeOH (162.2 mg), 60% MeOH (515.5 mg), 80% MeOH (780.3 mg) and 100% MeOH (804.0 mg). The three first fractions were grouped into fraction A after the thin-layer chromatography (TLC) analysis using chloroform/methanol (85:15 v/v) as eluent. The remaining fractions (60, 80 and 100% MeOH) were named as fractions B, C and D, respectively.

As fraction C presented the highest inhibition values between the four fractions, a new fractionation was conducted using normal-phase chromatography column and crescent solutions of methanol in chloroform (0-100%) (DA SILVA, B.P. *et al.*, 2017). After TLC analysis using chloroform/methanol (85:15 v/v) as eluent, nine subfractions were defined: C1 (9.0 mg), C2 (86.8 mg), C3 (56.1 mg), C4 (42.5 mg), C5 (59.6 mg), C6 (47.6 mg), C7 (127.7 mg), C8 (125.4 mg) and C9 (151.5 mg).

Subfraction C2 was purified on a normal-phase semi-preparative HPLC column using as eluent hexane/acetone (70:30 v/v, 3 mL/min flow rate) to obtain nine subfractions (C2-1–C2-9). Subfraction C2-5 (9.5 mg) was further purified using the same procedure and solvent above until isolation of compound **1** (2.4 mg; retention time 15 min).

Subfraction C5 was purified on a reversed-phase semi-preparative HPLC column using as eluent water/acetonitrile (50:50 v/v, 3 mL/min flow rate) to obtain four subfractions (C5-1–C5-4). Subfraction C5-2 (10.8 mg) was further purified using the same procedure and water/acetonitrile (60:40 v/v, 3 mL/min flow rate) as solvent until isolation of compound **5** (6.6 mg; retention time 7 min).

Subfraction C6 was purified on a reversed-phase semi-preparative HPLC column using as eluent water/acetonitrile (50:50 v/v, 3 mL/min flow rate) to obtain seven subfractions (C6-1–C6-7). Subfraction C6-7 (7.3 mg) was further purified using reversed-phase analytical Phenomenex HPLC column and using as eluent water/acetonitrile (60:40 v/v, 1 mL/min flow rate) until isolation of compound **3** (5.7 mg; retention time 18 min).

Subfraction C6-4 (10.9 mg) was also purified using the Phenomenex column and using as eluent water/acetonitrile (50:50 v/v, 1 mL/min flow rate) until isolation of compound **4** (6.7 mg; retention time 6 min).

Subfraction C7 was purified on a reversed-phase semi-preparative HPLC column using as eluent water/acetonitrile (60:40 v/v, 3 mL/min flow rate) to obtain six subfractions (C7-1–C7-6). Subfraction C7-2 (20.9 mg) was further purified using the same procedure and water/acetonitrile (65:35 v/v, 3 mL/min flow rate) as solvent until isolation of compound **7** (1.5 mg; retention time 6 min).

Subfraction C8 was purified on a reversed-phase semi-preparative HPLC column using as eluent water/acetonitrile (60:40 v/v, 3 mL/min flow rate) to obtain six subfractions (C8-1–C8-6). Subfraction C8-3 was further purified using the same procedure and solvent above until isolation of compound **2** (1.2 mg; retention time 19 min). Subfraction C8-2 was further purified using the same procedure and water/acetonitrile (65:35 v/v, 3 mL/min flow rate) until isolation of compound **6** (11.1 mg; retention time 5 min).

Spectroscopic data for new compounds. Brachialactol (**1**). Colorless oil; $[\alpha]_D^{20} = -96.5^\circ$ (*c* 1.0, CHCl₃); IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹; 3550 (OH); 980, 900, 890 (900>920, (25*R*)-spiroketal) ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) data, see Table 1; ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) data, see Table 1; positive-ion HREITOFMS *m/z* 353.2250 [M + H]⁺ (calcd for [M + H]⁺, 353.2232).

(25*R*)-spirost-5-en-3β,11α-diol-3-*O*-β-D-glucopyranoside, humidicine A (**4**). White amorphous solid; $[\alpha]_D^{20} = -41.5^\circ$ (*c* 1.0, MeOH); IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹; 3423 (OH); 1636 (C=C). ¹H NMR (MeOD, 600 MHz) data, see Table 1; ¹³C NMR (MeOD, 125 MHz) data, see Table 1; positive-ion HREITOFMS *m/z* 609.3924 [M + H]⁺ (calcd for [M + H]⁺, 609.3914). FABMS (*m/z*): 609.2 (M + H), 591.2 (M + H - H₂O), 429.2 (M + H - H₂O - 162).

3β,11α-hydroxycholest-5-en-22-one-6-*O*-β-D-glucopyranoside, humidicine B (**5**). White amorphous solid; $[\alpha]_D^{20} = -85.5^\circ$ (*c* 0.5, MeOH); IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹; 3420 (OH); 1695 (C=O). ¹H NMR (MeOD, 500 MHz) data, see Table 2; ¹³C NMR (MeOD, 125 MHz) data, see Table 2; positive-ion HREITOFMS *m/z* 591.3768 [M + H]⁺ (calcd for [M + H]⁺, 591.3757).

3β-hydroxycholest-5-en-22-one-11β-*O*-L-rhamnopyranoside-16-*O*-β-D-glucopyranoside, humidicine C (**6**) White amorphous solid; $[\alpha]_D^{20} = -7.8^\circ$ (*c* 0.5, MeOH);

IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} ; 3350 (OH); 1770, (C=O); ^1H NMR (MeOD, 500 MHz) data, see Table 2; ^{13}C NMR (MeOD, 125 MHz) data, see Table 2; positive-ion HREITOFMS m/z 741.4347 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $[\text{M} + \text{H}]^+$, 741.4327).

3β -hydroxycholest-5-en-22-one-11 β -*O*-D-xylopyranoside-16-*O*- β -D-glucopyranoside, humidicine D (**7**) White amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -18.8^\circ$ (c 0.5, MeOH); IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} ; 3350 (OH); 1770, (C=O); ^1H NMR (MeOD, 500 MHz) data, see Table 2; ^{13}C NMR (MeOD, 125 MHz) data, see Table 2; positive-ion HREITOFMS m/z 727.4190 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $[\text{M} + \text{H}]^+$, 727.4185).

Wheat Coleoptile Bioassay. *Urochloa humidicola* root extracts were pre-dissolved in 0.1% DMSO, and diluted with 2% sucrose in citrate-phosphate buffer (pH 5.6) until reaching the concentrations of 200, 400 and 800 ppm (NITSCH & NITSCH, 1956). A buffer-DMSO solution was used as negative control, and the positive control used was the herbicide Logran[®], which is a mixture of 59.4% terbutryn and 0.6% triasulfuron (Syngenta, Sevilla, Spain) (MACÍAS *et al.*, 2000).

Wheat seeds (*Triticum aestivum* L., cv. Catervo) were moistened in distilled water and germinated in Petri dishes ($\text{Ø} = 15$ cm), in dark. After 72 h, roots and caryopsis were manually removed, and the 2-mm-long coleoptile tip was removed using a Van der Weij guillotine. The remaining 4 mm coleoptile samples were collected for bioassay. Five coleoptile fragments plus 2.0 mL of each treatment solution were added in a test tube. A number of three tubes was used for each dilution. The tubes were horizontally disposed in a culture rotator and incubated in dark chamber (25 °C; 0.25 rpm). The entire process was conducted under a green safety light (NITSCH & NITSCH, 1956). After 24 h, coleoptiles were photographed on a dark paper sheet and measured using Photomed 4 software. The bioassay results are exposed in percentages of the negative control. For statistical analysis, data were submitted to Welch test, using 0.01 and 0.05 as significance levels (MACÍAS *et al.*, 2000).

Phytotoxicity Bioassays. Onion (*Allium cepa* L.), tomato (*Solanum lycopersicum* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.) and watercress (*Lepidium sativum* L.) were adopted as Standard Target Species (STS) due to their rapid growth and uniform germination (NITSCH & NITSCH, 1956; MACÍAS *et al.*, 2000). *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster, *Echinochloa crus-galli* L., *Lolium perenne* L., *L. rigidum* Gaudin and *Megathyrus maximus* (Jacq.) B.K.Simon & S.W.L.Jacobs (Poaceae), and *Amaranthus*

viridis L. (Amaranthaceae) were adopted as weed target species (CÁRDENAS *et al.*, 2017; DA SILVA, B.P. *et al.*, 2017). A separate bioassay was conducted with *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Fabaceae) as the Atlantic Forest-tree target species.

The REA extract was initially pre-dissolved in 0.1% DMSO, and diluted with 2-(N-morpholine)ethanesulfonic (MES) acid buffer (pH 6.0) until reaching the concentrations of 200, 400 and 800 ppm (MACÍAS *et al.*, 2000). A buffer-DMSO solution was used as negative control, and the positive control used was the herbicide Logran[®] (terbutryn 59.4% triasulfuron 0.6%, Syngenta).

Twenty seeds were placed on a Whatman n° 1 filter paper and disposed in a Petri dish ($\emptyset = 15$ cm for *A. colubrina*, $\emptyset = 5$ cm for STS and weed species). The filter paper was moistened with the corresponded treatment (15 mL solution for *A. colubrina*, 1 mL for STS and weed species). Each dish corresponded to a replicate, and a number of four dishes was adopted for each treatment. The entire process was conducted under a green safety light. Dishes were labelled and sealed with Parafilm[®], and incubated in a BOD chamber at 25 °C, in the dark (for *U. decumbens* and *A. colubrina*, a 16/8 h photoperiod was adopted). The bioassay lasted 5 (*L. sativum*), 6 (*L. sativa*, *S. lycopersicum*, *E. crus-galli*, *L. perenne* and *L. rigidum*), 7 (*A. cepa*), 8 (*A. viridis*, *U. decumbens* and *A. colubrina*) and 13 days (*M. maximus*) (CÁRDENAS *et al.*, 2017; DA SILVA, B.P. *et al.*, 2017).

After the phytotoxicity bioassays, root and shoot lengths were measured using a Fitomed[®] digitizing table (CASTELLANO, 2002). Germination and lengths were compared by the Welch test, using 0.01 and 0.05 as significance levels (MACÍAS *et al.*, 2000).

Microscopy analysis. After the phytotoxicity bioassay, samples of *A. colubrina* roots (0.1-0.5 cm from root tip) were collected, fixed in 2.5% glutaraldehyde, 4.0% paraformaldehyde and 0.05 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2), at room temperature for 2 h, and washed in the same buffer. Samples were dehydrated using crescent acetone series of 50%, 70%, 90% and 100% (1 h, each) for both optical (OM) and transmission electron (TEM) microscopies (FEITOZA *et al.*, 2018).

Dehydrated samples were embedded in Histo-resin[®] plastic resin (Leica, Wetzlar, Germany) for OM analysis. Cross sections (5 μm -thick) were obtained using a rotary microtome (Leica), stained with 1.0% toluidine blue O, and mounted on glass slides using

Entellan[®] medium. Sections were analyzed in a bright field microscope (Olympus BX 51, Tokyo, Japan), and photographed with a digital camera (Imaging Source, Charlotte, NC, USA) and software Image Pro Insight (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

For TEM analysis, root samples were post-fixed in 1.0% OsO₄ for 1h, dehydrated as above, embedded with epoxy-type resin (Leica) and polymerized at 60 °C for 48h. Semi-thin 0.60 µm sections were obtained using a Reichert Ultracuts-S (Leica) ultramicrotome and a diamond knife Diatome[®] (Hatfield, PA, USA) and collected with 300 mesh copper grids. The samples were contrasted with 5.0% uranyl acetate (40 min) and lead citrate (5 min) at room temperature, and observed with JEM 1400 Plus electron microscope (Jeol, Peabody, MA, USA) at 80 KV.

Results and Discussion

The indicative of phytotoxic compounds in *U. humidicola* (RIBEIRO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2017) led to the phytochemical study of its roots through bioguided isolation. In this sense, our results were obtained from analysis of extracts and fractions with demonstrated high bioactivity.

Extracts of *Urochloa humidicola* roots on wheat coleoptiles. From dried and grounded *U. humidicola* roots, distinct extracts were obtained. Aqueous extraction provided the root crude aqueous extract (**RCA**). The crude extract was submitted to a liquid-liquid extraction with ethyl acetate to obtain two fractions: root ethyl acetate (**REA**) and an root aqueous fraction (**RAF**). Another portion of root powder was extracted with *n*-hexane to remove lipid compounds. Half of residue was sequentially extracted with acetone (**RAc**) and methanol (**RMS**), whereas the remaining part was extracted with methanol only (**RMe**). All extracts were dissolved at 200, 400 and 800 ppm, and bioassayed against wheat etiolated coleoptiles, which is a rapid and sensible test to evaluate a wide variety of bioactive compounds. Besides, this bioassay is an important tool for bioguided prospection from plant extracts and fractions (MACÍAS *et al.*, 2000; DA SILVA, B.P. *et al.*, 2017).

Results of this bioassay are shown in Figure 1 and Table 1. Besides the herbicide reference (Logran[®]), **REA** was the most active extract, as it exhibited inhibition values of 50% (200 ppm) and 91% (800 ppm). After REA, the most bioactive extracts were **RAc**, **RMe** and **RMS**, as their inhibition ranged 65% at 800 ppm, although inhibition varied at 200 ppm (around 50, 45 and 25%, respectively). The extracts **RCA** and **RAF** were less active and presented around 20% of inhibition. This result shows these compounds were

very soluble in ethyl acetate, which explains the obtained result. Thus, **RCA** inhibition values were low. **RCA** assembles the bioactive compounds and many other molecules, such as sugars and proteins, which contribute in weight rather than in bioactivity. When **RCA** was extracted with ethyl acetate, this fraction (**REA**) was enriched with bioactive compounds, which increased significantly its inhibitory activity, whereas the remaining fraction (**RAF**) did not show a significant result (Figure 1). IC_{50} values (Table 1) also reflected this tendency, as **REA** exhibited the lowest value (175.4 ppm).

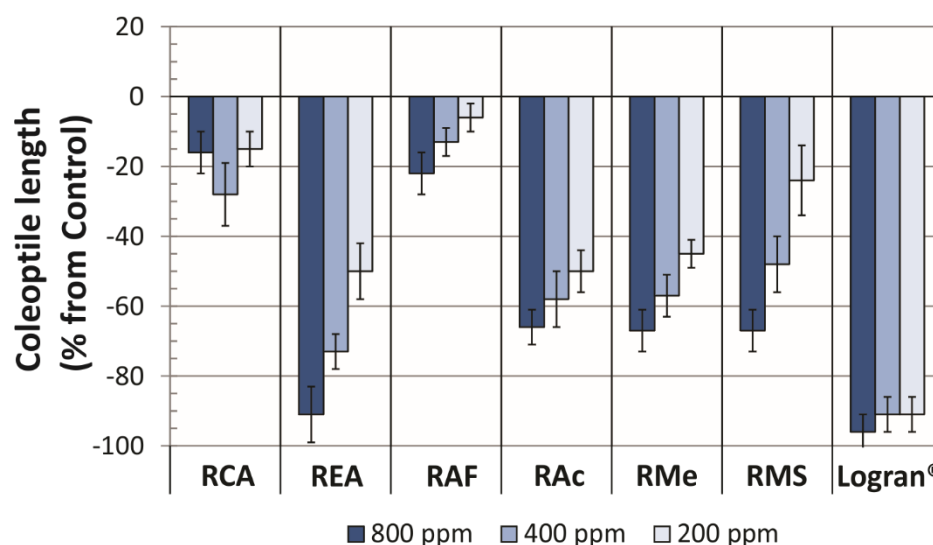


Figure 1. Effect of distinct extracts of *Urochloa humidicola* root on wheat coleoptile length (n=5, r=3). RCA = root crude extract; REA = ethyl acetate extract from RCA; RAF = aqueous fraction from RCA; RAc = acetone extract; RMe = methanol extract; RMS = methanol extract obtained sequentially.

Table 1. IC_{50} and r^2 values for each *Urochloa humidicola* root extract and fraction, after wheat coleoptile bioassay ($p = 0.05$).

Treatment ^a	IC_{50} (ppm)	r^2
RCA	3514.0	0.9584
REA	175.4	0.9881
A	2205.0	0.9820
B	499.1	0.9938
C	101.2	0.9884
D	233.1	0.9288
RAF	2803.0	0.9999
RAc	257.3	0.9771
RMe	290.2	0.9903
RMS	457.4	0.9918

^a RCA = root crude aqueous extract; REA = root ethyl acetate extract from RCA, where A-D are its fractions; RAF = root aqueous fraction from RCA; RAc = root acetone extract; RMe = root methanolic extract; RMS = root methanolic extract obtained after acetone extraction.

Phytotoxicity of *U. humidicola* root extract on target species. Results of the phytotoxicity bioassay against distinct target species are shown in Figures 2 and 3. Since REA presented the highest bioactivity, this extract was tested on germination and initial development of four standard target species – STS (*A. cepa*, *L. sativa*, *L. sativum* and *L. esculentum*) (MACÍAS *et al.*, 2000), five weed species, particularly problematic in agriculture (*E. crus-galli*, *L. perenne*, *L. rigidum*, *M. maximus* e *A. viridis*) (DA SILVA, B.P. *et al.*, 2017), and the exotic weed *U. decumbens*, which was also introduced as a pasture crop in Brazil, and is considered an invasive threat to ecosystems (NEPOMUCENO *et al.*, 2017).

Bioassay results on the STS demonstrated the phytotoxic activity of **REA** on the monocotyledonous *A. cepa* and on the eudicot *L. esculentum*. The extract inhibited *A. cepa* root growth around 60% at 400 and 800 ppm, and also presented inhibition on shoot length by more than 40%. Inhibition of *L. esculentum* roots and shoots was nearly 50%. The least affected species was *L. sativa*, which had showed greater resistance to natural products in earlier studies (DA SILVA, B.P. *et al.*, 2017; DURÁN *et al.*, 2019). These results suggest the phytotoxic potential of **REA** on other target species. Among the assayed weeds, *E. crus-galli*, *A. viridis* and *M. maximus* were the most affected. The eudicot *A. viridis* was the most sensitive among target species, as root and shoot growth inhibition values varied among 90% at 400 and 800 ppm of **REA**, greater values than those of Logran[®].

The monocots *E. crus-galli* and *M. maximus* were inhibited by nearly 60% or more in root growth, which was the most sensible parameter. In both weeds, the extract inhibitor effects were greater than those of the herbicide Logran[®]. Phytotoxicity is usually less evident in seed germination, and more conspicuous on postgerminative initial development (FERREIRA & AQUILA, 2000), which supports data from this study. Belowground roots are typically responsible by nutrient uptake from the soil. Due to this intrinsic role, roots become more susceptible to distinct types of stress (CRUZ-ORTEGA *et al.*, 1998), which may explain why roots are more affected than shoots after REA treatment, as shown in earlier reports (MACÍAS *et al.*, 2000; DA SILVA, B.P. *et al.*, 2017; NEPOMUCENO *et al.*, 2017; FEITOZA *et al.*, 2018).

The inhibitory effect of REA on weeds prompt further studies on *U. humidicola* usage for the biological control of weeds, since those species are considered invaders at both agriculture systems and natural ecosystems. The grass *U. decumbens* was the only

weed unaffected by the treatment, which may suggest absence of autotoxicity among *Urochloa* species (SINGH *et al.*, 1999).

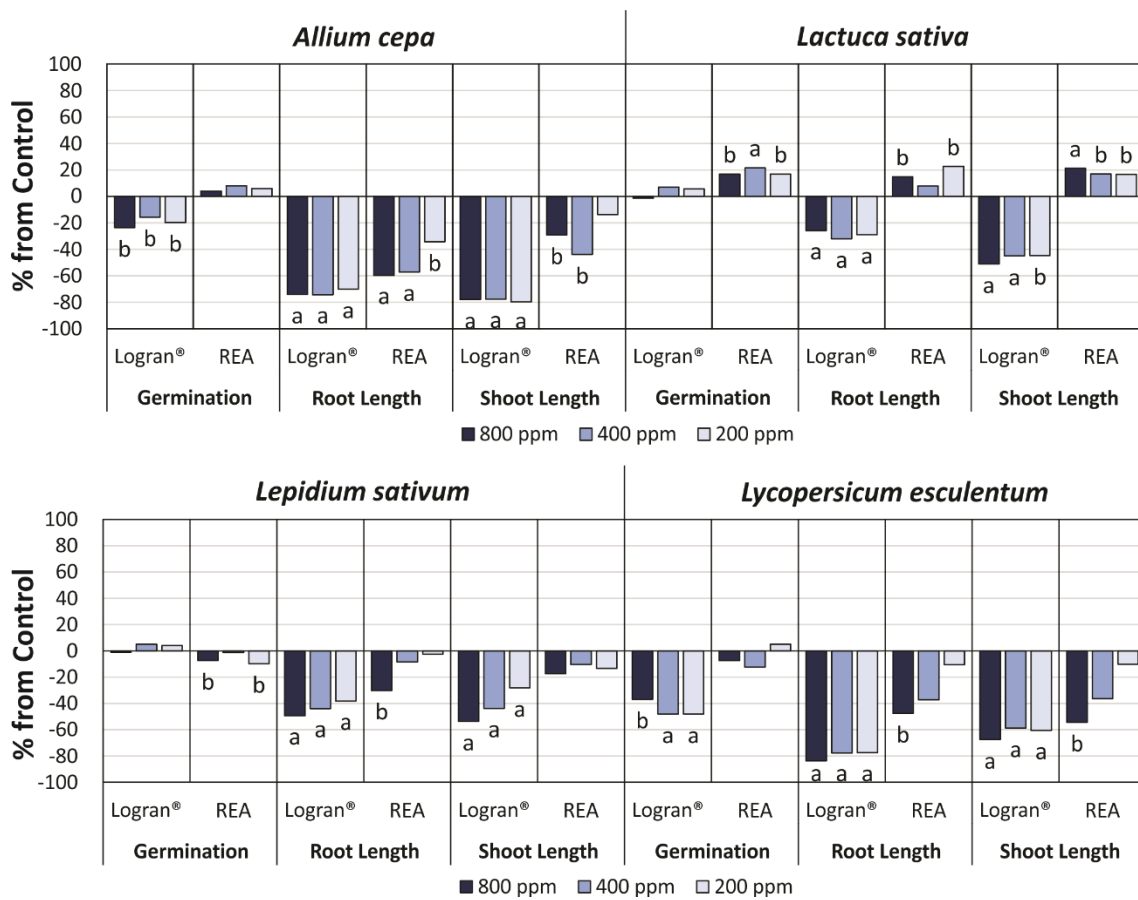


Figure 2. Effect of ethyl acetate extract (REA) of *Urochloa humidicola* roots on seed germination, root length and shoot length (n=20, r=4) of Standard Target Species (STS). Values are displayed as percentages of control. (a) and (b) indicate statistical significance in comparison to control after Welch test, considering $p = 0.01$ and $p = 0.05$, respectively.

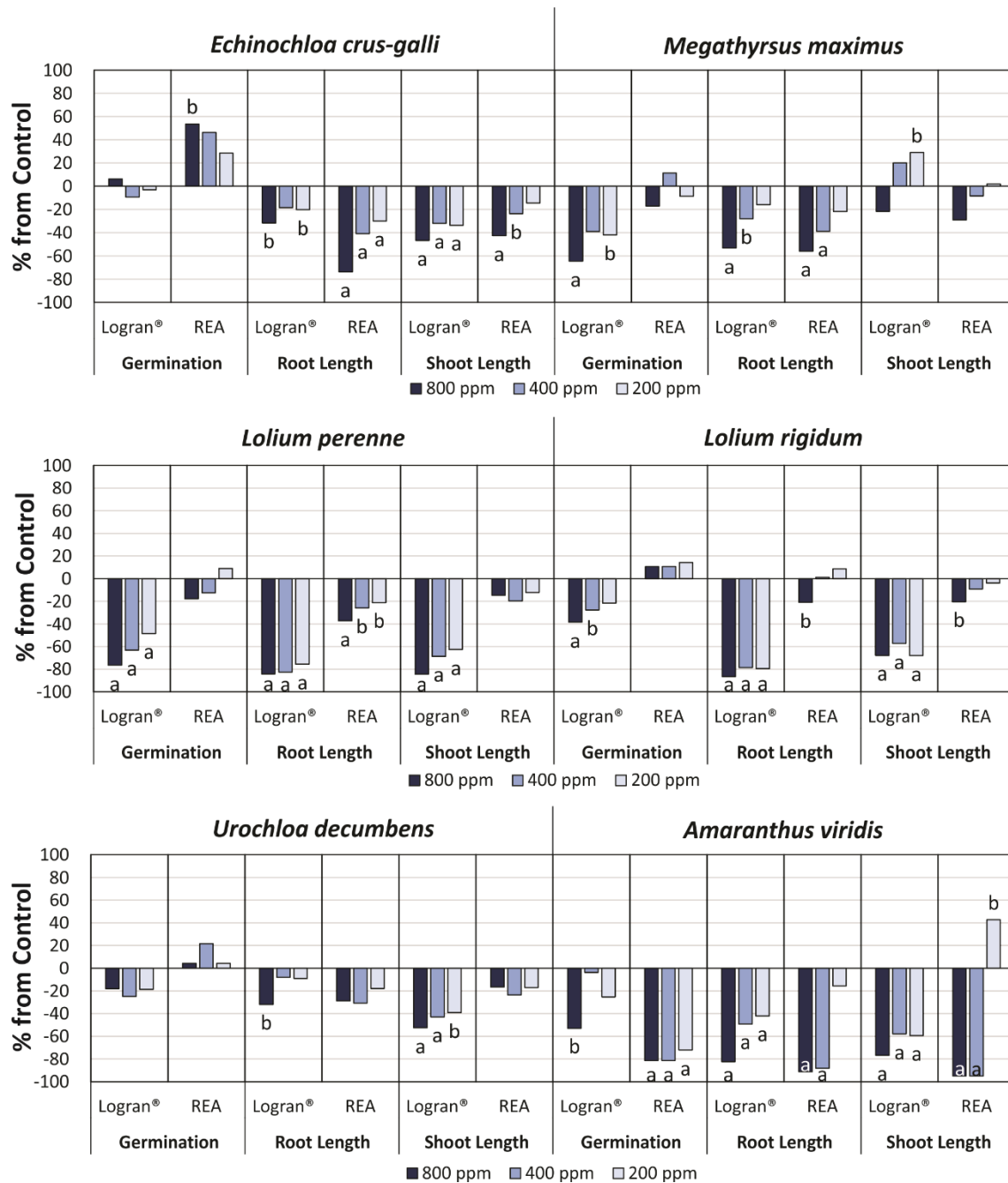


Figure 3. Effect of ethyl acetate extract (REA) of *Urochloa humidicola* roots on seed germination, root length and shoot length (n=20, r=4) of weed species. Values are displayed as percentages of control. (a) and (b) indicate statistical significance in comparison to control after Welch test, considering $p = 0.01$ and $p = 0.05$, respectively.

Phytotoxicity of *U. humidicola* root extract on *Anadenanthera colubrina*. The Brazilian tree species *Anadenanthera colubrina* has been used in ecological restoration programs through its reintroduction in degraded environments (BISPO *et al.*, 2017; MOTA *et al.*, 2017). However, field studies showed *A. colubrina* establishment was impaired under influence of *U. brizantha* joint cultivation (VIEIRA *et al.*, 2019). According to these authors, *U. brizantha* fast growth and competition for water and other

soil resources have limited *A. colubrina* development. This is the first study to report *U. humidicola* phytotoxicity on *A. colubrina* (Figure 4). The REA extract at 800 ppm inhibited seed germination by 63% and root growth by 66% in a similar proportion to Logran® at the same concentration. Shoot growth inhibition was considerably lower, as the inhibition value at 800 ppm was 37%. Lower dilutions did not cause significant changes on plant development.

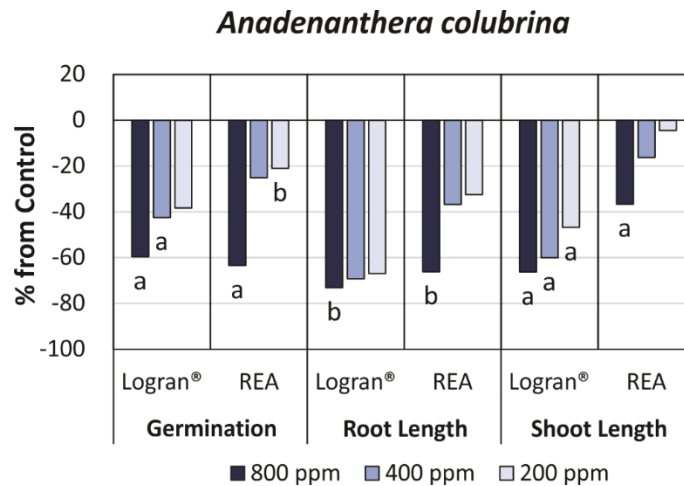


Figure 4. Effect of ethyl acetate extract (REA) of *Urochloa humidicola* roots on seed germination, root length and shoot length (n=15, r=4) of *Anadenanthera colubrina*. Values are displayed as percentages of control. (a) and (b) indicate statistical significance in comparison to control after Welch test, considering $p = 0.01$ and $p = 0.05$, respectively.

The activity of secondary metabolites produced by *U. humidicola* may exert a facilitator mechanism to the invasion process of this exotic species into a new environment (CALLAWAY & RIDENOUR, 2004). Moreover, *U. humidicola* advantages on fast growth, C₄ photosynthetic pathway, adaptation to nutrient-poor soils and to water stress, and high seed production (RIBEIRO *et al.*, 2012; DE FARIA *et al.*, 2015; SOUZA-ALONSO *et al.*, 2017) may also take part on its dominance over native species.

Effect of *U. humidicola* extract on *A. colubrina* anatomy. Changes on *A. colubrina* root development, after treatment with the *U. humidicola* REA extract at 800 ppm, led to analysis of REA effect on *A. colubrina* root anatomy. Conspicuous anatomical changes were observed in comparison to the negative control (distilled water).

Negative control *A. colubrina* individuals, 0.5 cm from root tip (Figure 5 A-B), exhibited typical primary root structure, with uniseriate rhizodermis, cortex with

indistinct exodermis, cortical parenchyma formed by approximately seven cell layers, and uniseriate endodermis. The central cylinder was formed by a uniseriate and parenchymatous pericycle, a tetrarch xylem, composed by 4-6 vessel elements per pole, and small phloem groups constituted by sieve-tube elements, companion cells and parenchyma cells. A secondary root structure is noted at 1.0 cm from root tip (Figure 5 C). In this case, the central cylinder is comprised by phloem cells, 2-3 layers of tabular cells forming the cambium, and thick-walled fibers next to the xylem.

Cross sections, at the same region, of REA-treated *A. colubrina* (800 ppm) exhibited an anatomical structure of root-shoot transition (Figure 5 D-E). Cortical parenchyma is formed by around 20 cell layers, and the endodermis is indistinct. In the central cylinder, sieve-tube elements are next to early-developing fibers, and are located outside the xylem, which is also formed by thick-walled fibers. Moreover, a ground parenchyma is well developed at the center (Figure 5 E).

After treatments with REA at 400 ppm (Figure F-G) and 200 ppm (Figure H-I), an early secondary root structure was observed 0.5 cm from root tip. Cortex parenchyma is composed by 10-12 cell layers, and the endodermis is formed by a single layer of tabular cells (Figure 5 G). The phloem is comprised by small groups next to the pericycle. Primary xylem is found as exarch and surrounded by fibers (Figure 5 G,I).

The REA extract led to anatomical changes in *A. colubrina* at the same region, such as an increase of cell layers at the cortex and the central cylinder, and formed either a root-shoot transition structure, or an initiation of secondary root structure. The observed increase in width may be related to the decreased root length, as observed in earlier reports (CHON *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2017). The distinct development stages observed in this study, at the same region in relation to the root tip, are also associated to the inhibition of root longitudinal growth (RIBEIRO *et al.*, 2015; FEITOZA *et al.*, 2018). The REA extract also led to an early differentiation of both phloem and xylem fibers. Distinct allelochemicals may enhance lignification in vessel elements and fibers. Dos Santos *et al.* (2008) observed this effect in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) roots after treatment with 1.0 mM ferulic acid.

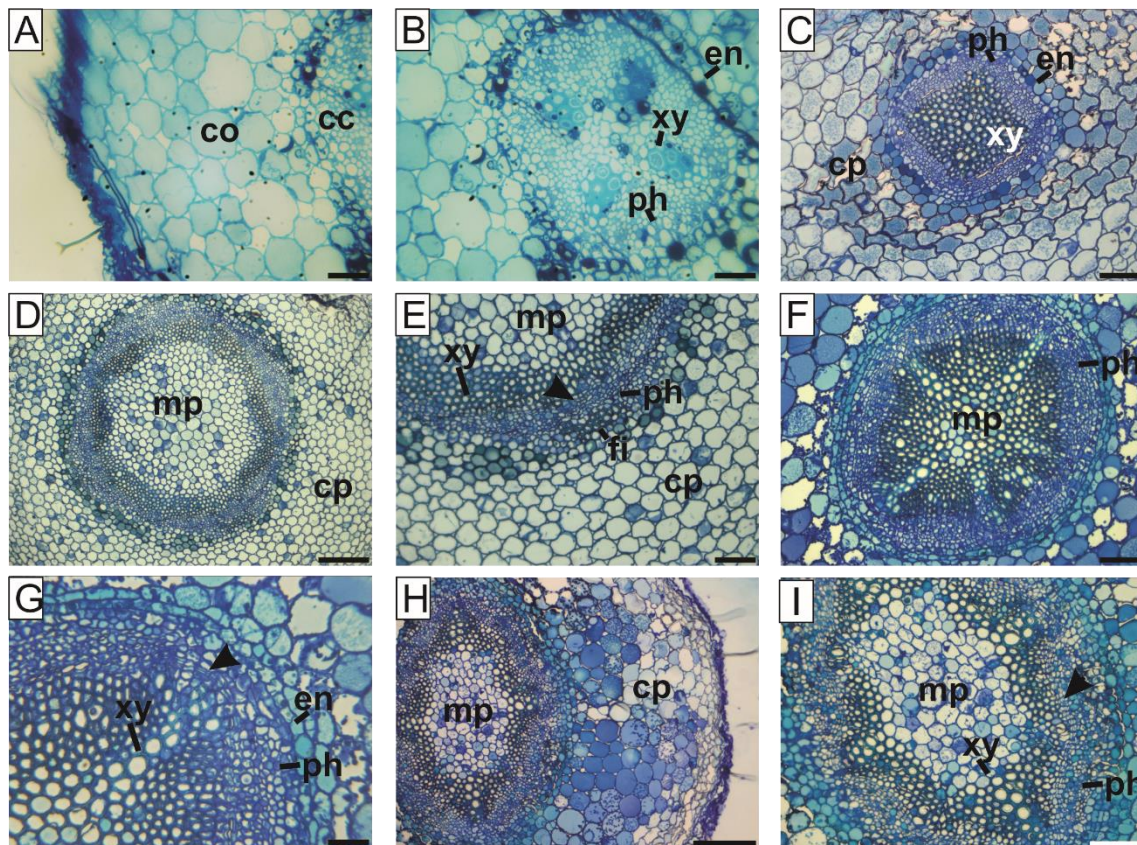


Figure 5. Cross section of *Anadenanthera colubrina*, 0.5 cm from root tip. (A-C) Control. (A) Cortex. (B) Central cylinder, exhibiting tetrarch xylem. (C) Central cylinder (1.0 cm from root tip), with developed secondary xylem. (D-E) Ethyl acetate extract (REA) of *Urochloa humidicola* roots, 800 ppm. (F-G) REA, 400 ppm. (H-I) REA, 200 ppm. (D, F, H) General aspect. (E, G, I) Detail of vascular elements and cambium (▶). cc = central cylinder, co = cortex, cp = cortical parenchyma, en = endodermis, fi = fibers, mp = medullar parenchyma, ph = phloem, xy = xylem. Bars: A, B, G = 30 μ m; C, E, F, I = 60 μ m; D, H = 150 μ m.

Ultrastructural effect of *U. humidicola* extract on *A. colubrina* roots.

Anatomical changes in *A. colubrina* caused by REA extract led to TEM analysis, at the same region of anatomical analysis, in order to detect alterations at the cellular level (Figure 6).

Ultrastructural analysis of control *A. colubrina* roots exhibited turgid parenchyma cells with one large vacuole and a large and conspicuous nucleus (Figure 6 A). Phloem cells presented granulated cytoplasm due to high abundance of polyribosomes. Golgi complex and rough endoplasmic reticulum were also evident, as well as a globoid chloroplast with a starch grain. Mitochondria were abundant and exhibited invaginations forming cristae, without any marked alterations (Figure 6 A-B).

REA extract at 800 ppm cause considerable damage at the endomembrane structures (Figure 6 C-D). Cell wastes were found either in the cytoplasm or stored in the vacuole. Moreover, smaller vacuoles were detected next to larger vacuoles, indicating

vacuolization (Figure 6 C). The same treatment at 200 ppm caused accumulation of globoid electron-dense deposits either next to the vacuole membrane, or occupying the entire vacuole (Figure 6 E). Although the nature of these deposits is unknown, such effect was already observed after treatment with phenolic compounds (ARANITI *et al.*, 2018; FEITOZA *et al.*, 2018). Vacuolization may be an alternative for degradation of cell toxins (BURGOS *et al.*, 2004; GRAÑA *et al.*, 2017), or an initial process of autophagy, in order to eliminate degraded organelles (YANG *et al.*, 2011). Both electron-dense deposits and the cellular wastes are probably being transported and stored in the vacuoles as a mechanism of cell repair. Also, *A. colubrina* cell nucleus were found degraded, with small chromatin region (Figure 6 F), after REA treatment. Chromatin degradation may be an indicative of programmed cell death (POÓR *et al.*, 2019).

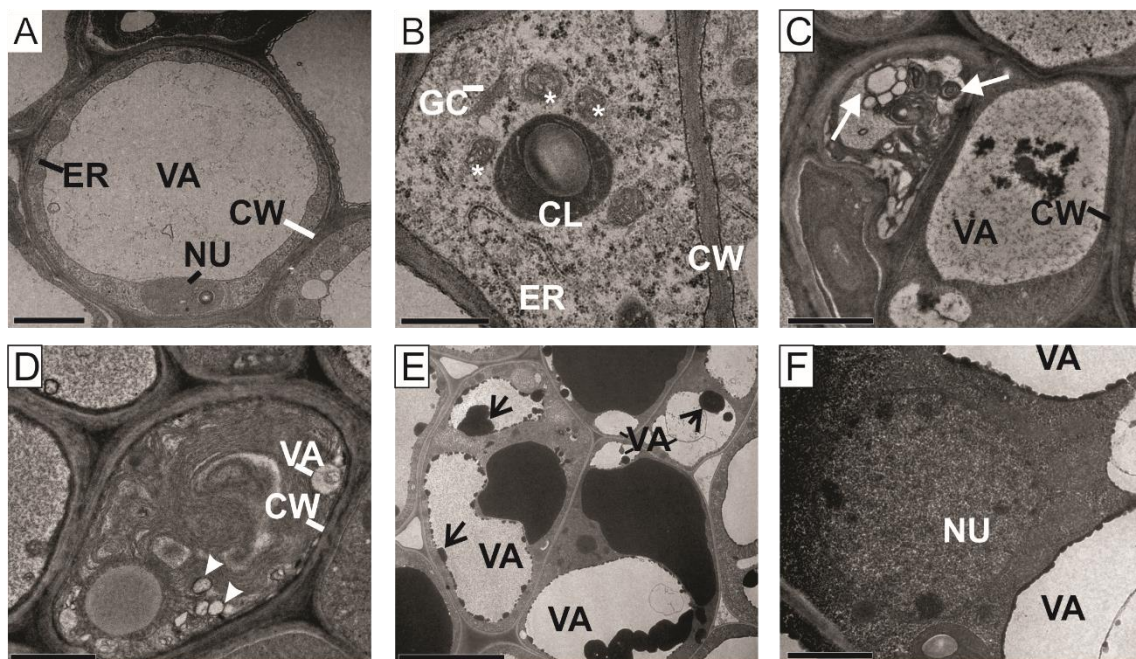


Figure 6. *Anadenanthera colubrina* root cells, 0.5 cm from root tip, as observed in Transmission Electron Microscopy (TEM). (A-B) Control. (A) Parenchyma cell exhibiting large vacuole and conspicuous nucleus. (B) Phloem cell, indicating intact organelles. (*) Indicates mitochondria with intact cristae. (C-D) Ethyl acetate extract (REA) of *Urochloa humidicola* roots, 800 ppm. (C) General aspect of phloem cells. Note osmiophilic-dense deposits in the center of the vacuole, and cellular wastes (→). (D) Degraded organelles in cytoplasm, small vacuole, and starch grains (▶). (E-F) REA, 200 ppm. (E) Central cylinder cells. Note electron-dense deposits next to vacuole membrane (→), or occupying the whole vacuole. (F) Detail of nucleus with degraded chromatin. CL = chloroplast, CW = cell wall, ER = endoplasmic reticulum, GC = Golgi complex, NU = nucleus, VA = vacuole. Bars: A, C, D, E, F = 2 μm; B = 1 μm; E = 10 μm.

Isolation and structural characterization of compounds from REA extract.

Once REA phytotoxicity was demonstrated, isolation and characterization of major

compounds present in this extract were conducted in a bioguided way. Therefore, the REA extract was fractionated by reversed-phase column chromatography, using RP-18 as stationary phase, and crescent solutions of methanol in distilled water (0-100%) as mobile phase. From the four yielded fractions (A, B, C and D), the fraction C presented the highest inhibitory activity after new wheat coleoptile bioassay. Inhibition values were 88% at 400 ppm and 97% at 800 ppm, and were similar to Logran[®] treatment (Figure 7; Table 1).

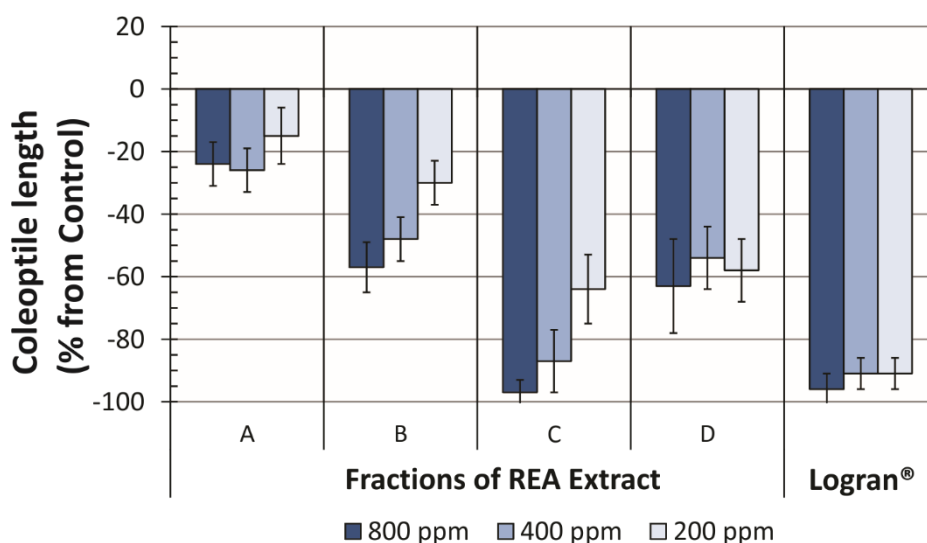


Figure 7. Effect of distinct fractions of ethyl acetate extract (REA) of *Urochloa humidicola* roots on wheat coleoptile length (n=5, r=3).

The fraction C was submitted to chromatographic methods to isolate compounds **1-7** (Figure 8); five out of seven are novel compounds (**1, 4-6**). Chromatography yielded saponin-rich subfractions, except for **1**. Their structures were elucidated through mass spectrometry, IR, and NMR 1D and 2D spectroscopy.

Compound **1** was obtained as a colorless oil. Its molecular formula was deduced as C₂₀H₃₂O₅ on the basis of its HRTOFESIMS ion peak at m/z 275.2147 [M+H]⁺ and its ¹³C NMR data (Table 2, Figure 9). Homo and heteronuclear correlations in the NMR experiments agreed of a cyclic diterpene, that presented a dicyclopenta[a,d]cyclooctane skeleton (5-8-5 ring system). Similar 5-8-5 tricyclic terpenoids with a γ -lactone ring have been found in the root exudates of the tropical forage grass *Urochloa humidicola*, named brachialactone, which showed a high activity on regulation of nitrification inhibition (SUBBARAO *et al.*, 2009).

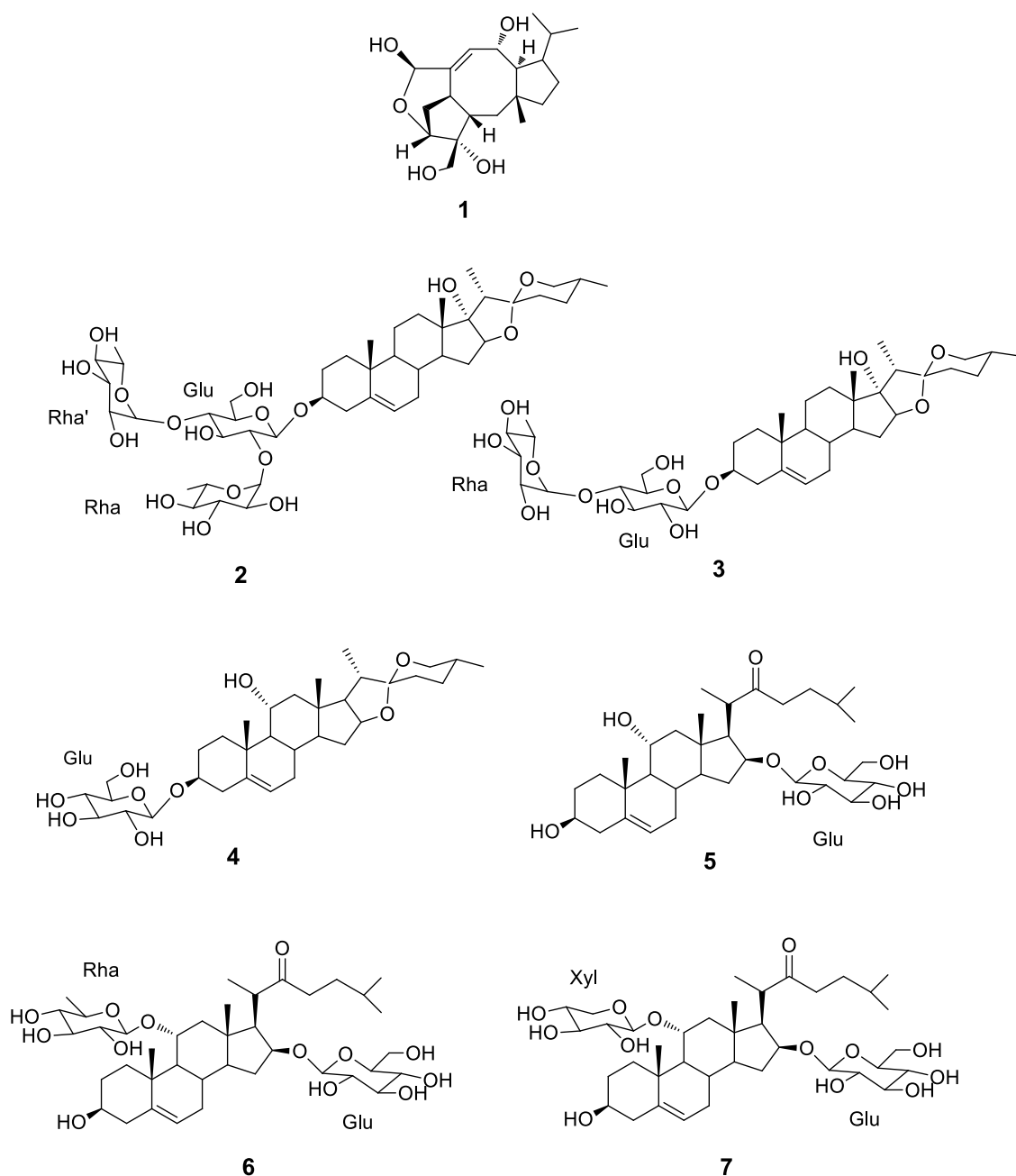


Figure 8. Isolated and characterized compounds from *Urochloa humidicola* roots. **1.** Brachialactol, isolated from the subfraction C2-5. **2.** Pennongenin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside, isolated from the subfraction C8-3. **3.** Floribundasaponin B, isolated from the subfraction C6-7. **4.** Humidicine A, isolated from the subfraction C6-4. **5.** Humidicine B, isolated from the subfraction C5-2. **6.** Humidicine C, isolated from the subfraction C8-2. **7.** Humidicine D, isolated from the subfraction C7-2.

The IR spectrum of compound **1** indicated the existence of hydroxyl groups (3420 cm^{-1}). Overall, the NMR features of brachialactone (SUBBARAO *et al.*, 2009) showed similarity to those of **1** except for the absence of the carbonyl group at C-19 and the appearance of a signal at δ_{H} 5.41 and δ_{C} 104.2, assigned to an acetal carbon at C-19. Furthermore, the presence of an additional hydroxyl group (δ_{H} 4.73, δ_{C} 104.2), at C-9. ^1H -

^1H -COSY experiment confirmed this hydroxyl group at this position by correlation of this signal with those of H-8 and H-10 (Figure 9).

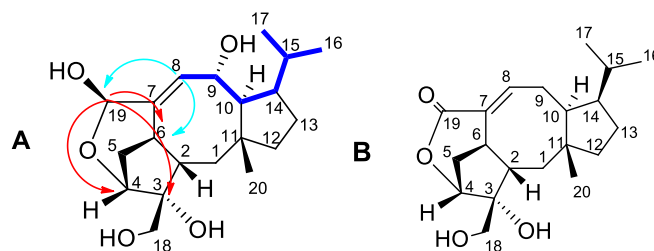


Figure 9. A) Key HMBC (arrows H→C) and ^1H - ^1H -COSY correlations for compound **1**. B) Brachialactone isolated from roots exudates of *Urochloa humidicola* (SUBBARAO *et al.*, 2009).

Table 2. ^1H NMR and ^{13}C Spectroscopic Data for compound **1** (CH_3CD)^{a,c}

1			
no.	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	HMBC
1a	1.60 dd (14.8, 12.1)	37.7	C-6, C-10, C-11, C-12
1b	1.79 dd (14.8, 5.2)		
2	1.89 ddd (12.1, 5.2, 5.2)	50.4	
3		89.3	
4	4.58 dd (4.5, 1.8)	79.6	
5a	1.58 d (11.3, 2.0)	36.1	C-2, C-3, C-4
5b	2.15 d (11.3, 2.0)		
6	3.16 br	41.9	
7		132.8	
8	5.39 d (5.8)	131.7	C-6, C-19
9	4.73 dd (5.8, 4.5)	68.6	C-7, C-10
10	1.75 dd (5.4, 10.7)	63.8	
11		42.8	
12a	1.40 ddd (12.2, 11.8, 8.0)	45.4	
12b	1.44 dd (11.8, 7.3)		
13a	1.45 ddd (11.2, 8.0, 5.4)	23.8	
13b	1.66 dddd (12.2, 11.2, 10.4, 7.3)		
14	2.25 dddd (10.7, 10.4, 7.8, 5.4)	47.3	
15	2.28 dq (7.8, 6.8, 6.7)	30.4	
16	0.97 d (6.7)	23.1	C-14, C-15, C-17
17	0.91 d (6.8)	21.6	C-14, C-15, C-16
18a	3.57 d (11.4)	62.1	C-3, C-4
18b	3.80 d (11.4)		
19	5.41 s	104.2	C-3, C-4, C-6, C-7
20	1.06 s	19.9	C-1, C-10, C-12, C-11

^aData were measured at 500 MHz (^1H NMR) and 125 MHz (^{13}C NMR).

^cAssignments were confirmed by ^1H - ^1H -COSY, 1D-TOCSY, HSQC, and HMBC experiments.

Next, the HMBC spectrum showed additional long-range correlations from H-19 to C-3, C-4, C-6 and C-7 also confirmed the location of the acetal carbon at C-19 (δ_{C}

104.2), and from H-8 to C-6 and C-19, ascribable of proton H-19 in α position to double bond (C7-C8) (Figure 9). ^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC, the ^1H and ^{13}C NMR data are summarized in Table 2 and Figure 9.

Relative configuration for hydroxyls at C-9 and C-19 positions were determined by using NOE information, and the absolute configuration was assumed to be that of brachialactone (SUBBARAO *et al.*, 2009) for compound **1** as appears on Figure 9. Therefore, structure **1** was elucidated and was named brachialactol.

Compounds **2** and **3** (Figure 8) were identified as the furanostanic steroidal saponins. These saponins have the same aglycone, pennogenin, and both presented carbohydrate units, glucose linked directly to C-3 of the aglycone and two rhamnoses linked to the glucose at C-2' and C-4' for compound **2** and only one rhamnose linked at C-4' for compound **3**. Compounds **2** and **3** were identified by comparison of their physical and spectroscopic data with published as pennongenin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (**2**) (OLIVEIRA *et al.*, 2017) and floribundasaponin B (**3**) (MAHATO *et al.*, 1981). Compound **2** was previously isolated from the methanolic extract obtained from roots of this plant (SUBBARAO *et al.*, 2009).

Compound **4** was isolated as a white amorphous solid with a molecular formula $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{O}_9$ as determined by positive-ion HRTOFESIMS m/z 615.35114 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, cal. 615.3509) and the NMR data (Table 3). FABMS (m/z): 609.2 ($\text{M}+\text{H}$), 591.2 ($\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}$), 429.2 ($\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-162$) implied that the compound contained one sugar unit. The presence of hydroxy and double bond functionalizations were deduced from the IR absorption bands at 3423 and 1636 cm^{-1} , respectively.

Careful analysis of the 1D- and 2D-NMR data for the aglycone of **4** disclosed that it contained the same C-F rings as in compounds **2** and **3** (ONO *et al.*, 2007). The main differences observed in C- and D-rings, were one additional signal at δ_{H} 1.77 (1H, *m*, H-17) and an oxygenated methine (δ_{H} 3.97; δ_{C} 69.2). Key ^1H - ^1H -COSY correlations (Figure 10) of δ_{H} 1.98 (H-7)/ δ_{H} 1.58 (H-8)/ δ_{H} 1.02 (H-9)/ δ_{H} 3.97 (H-11) suggested location of the oxygenated methine at C-11. This was also supported by HMBC correlations (Figure 10) from H-11 to C-9, C-10 and C-12, and from Me-19 to C-1, C-5, C-9, C-10 and C-11. The α -orientation of the OH-11 was deduced from ROESY-1D correlation of δ_{H} 3.97(H-11) to δ_{H} 1.17 (H-19), and δ_{H} 0.81 (H-18). The other parts were determined to be the same as those of diosgenin by 2D NMR experiments. Based on the above evidence, the aglycone **4** was elucidated as (25*R*)-spirost-5-ene-3 β ,11 α -diol.

Complete assignment of sugar, including elucidation of the stereochemistry by analysis of the coupling constants, was also achieved by considering the HSQC, HMBC, ^1H - ^1H -COSY, and TOCSY spectra (assignments in Tables 3 and 4).

The cross peaks in the HMBC experiment between H-1' at δ_{H} 4.37 and C-3 of the aglycone at δ_{C} 79.9 showed that the glucose moiety was attached to the aglycone at the C-3 position. Thus, compound **4** was elucidated as (25*R*)-spirost-5-en-3 β ,11 α -diol-3-*O*- β -D-glucopyranoside, and it was named humidicine A (Figure 10).

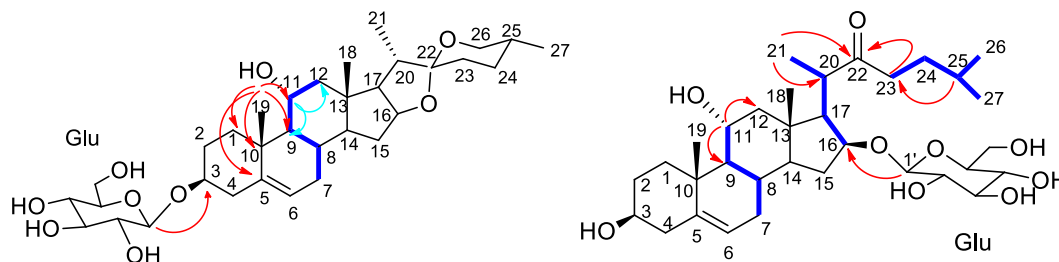


Figure 10. Key HMBC (red arrows H→C) and ^1H - ^1H -COSY (blue lines) correlations for **4** and **5**.

Compound **5** was isolated as a white amorphous solid. Its molecular formula was determined as $\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{O}_9$ by the positive HRTOFESIMS at m/z : 617.3677 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. The IR spectrum indicated the existence of hydroxyl group(s) (3420 cm^{-1}) and carbonyl group (1695 cm^{-1}). In comparison to **4**, the ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra (Tables 3 and 4) suggested now a C27 steroidal saponin having a cholestane skeleton for compound **5**. The ^{13}C -NMR spectrum showed 33 signals where the main differences of compound **5** with respect to **4**, is the disappearance of the spirostane carbon in C-22 and the appearance of a carbonyl group at this position.

The ^1H -NMR spectrum (Tables 3 and 4) showed as more shielded signals of a typical cholestane skeleton with two tertiary methyl groups at δ_{H} : 0.92 (18-h), 1.16 (19-H); and three secondary methyl groups at δ_{H} 1.16 (H-21), 0.89 (H-26), and δ_{H} : 0.89 (27-H). Furthermore, as more unshielded signals, the spectra showed three oxygenated methane protons at δ_{H} : 3.38 (H-3), 3.98 (H-11), and δ_{H} : 4.09 (H-16), and one olefinic proton signal at δ_{H} : 5.39 (H-6), and the anomeric proton at δ_{H} : 3.92 (H-1'), which indicated the presence of one sugar unit.

Next, the location of the carbonyl carbon signal at C-22 (δ_{C} 218) was shown by correlation of signals in the ^1H - ^1H -COSY and HMBC spectrum from the terminal secondary methyl groups (H-21, H-26 and H-27) (Figure 10; Tables 3 and 4). The sugar was identified a glucose like in compound **4**, and location of this β -glucose group at C-

16 was shown by a correlation between the signals of the anomeric proton at δ_{H} 3.92 and the carbon signal at δ_{C} 81.9 (C-16) in HMBC spectrum. The α orientation of the H-16 was deduced from ROESY-1D correlation of δ_{H} 4.09 (H-16) to δ_{H} 1.82 (H-17) and anomeric proton (δ_{H} 0.92, H-1'). Thus, compound **5** was elucidated as $3\beta,11\alpha$ -hydroxycholest-5-en-22-one-6-*O*- β -D-glucopyranoside, and it was named humidicine B.

Compound **6** was isolated as a white amorphous solid with molecular formula $\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{O}_{13}$ as determined by the HRTOFESIMS data exhibiting a positive-ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ at m/z 763.4246 and its ^{13}C -NMR data. By comparing its ^1H and ^{13}C NMR data (Tables 3 and 4) with those of **5**, compound **6** has the same aglycone. Furthermore, a signal due to a second anomeric proton appeared at δ_{H} 4.88 (H-1'') which gave correlation with ^{13}C NMR signals at δ_{C} 99.2 (C-1'') (Table 3 and 4). The sugars units were determined to be, one a β -glucopyranosyl moiety (as to compound **5**, Figure 10) and other, an α -rhamnopyranosyl by its ^1H and ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC, TOCSY and ROESY experiments. From HMBC correlations the linkage of sugar residues were deduced. The cross peaks between H-1' of glucose (δ_{H} 3.92) and C-16 of aglycone (δ_{C} 81.9) showed that the glucose moiety was attached at the same position as compound **5**; and between H-1'' of rhamnose (δ_{H} 4.88) and C-11 of the aglycone (δ_{C} 76.0) indicated that the rhamnose moiety was attached at this C-11 position (Figure 11). The above data led to the structure of **6** as 3β -hydroxycholest-5-en-22-one-11 β -*O*-D-rhamnopyranoside-16-*O*- β -D-glucopyranoside, and it was named humidicine C.

Compound **7**, isolated as a white amorphous solid, had a molecular formula of $\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{O}_{13}$, based on the HRTOFESIMS data (m/z 749.4072 $[\text{M}+\text{Na}]^+$). Overall, the NMR features of **7** (Tables 3 and 4) showed a high similarity to those of **6** (Figure 11), except for the placement of the monosaccharide moiety rhamnopyranosyl by a xylopyranosyl group at the same C-11 position. Furthermore the ^1H -NMR, ^{13}C -MNR, ^1H - ^1H -COSY, HSQC, HMBC, TOCSY and ROESY assignments of this sugar were in good agreement with those D-xylopyranosides. The structure of **7** was shown to be 3β -hydroxycholest-5-en-22-one-11 β -*O*-D-xylopyranoside-16-*O*- β -D-glucopyranoside, and it was named humidicine D.

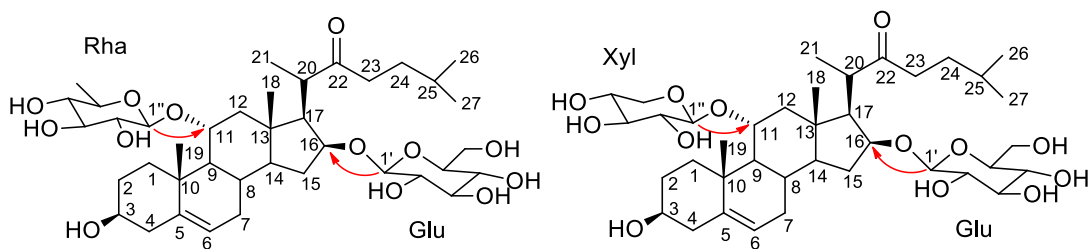


Figure 11. Key HMBC (red arrows H→C) correlations between sugar and aglycone for **6** and **7**.

This is the first report of brachialactol (**1**) in the literature. This diterpenoid shows a similar structure to brachialactone (Figure 9), a compound from *U. humidicola* exudates, which is related to biological nitrification inhibition (BNI) (SUBBARAO *et al.*, 2009). Nitrification is the conversion of NH_4^+ to NO_3^- by soil bacteria. Since *U. humidicola* presents high affinity to NH_4^+ , this activity may represent a competitive advantage over native species (NAKAMURA *et al.*, 1998; SULLIVAN *et al.*, 2017), which reflects the success of this grass as an invader species.

This study presents six compounds belonging to saponins, isolated from *U. humidicola* roots, four of them are new in the literature. Previous studies had detected saponins in the leaves of *U. ruziziensis* (NEPOMUCENO *et al.*, 2017) and *U. decumbens* (PIRES *et al.*, 2002), and also in *U. humidicola* roots (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Roots have been recognized as a storing site of phytotoxic saponins (OLESZEK, 1993; HOAGLAND *et al.*, 1996). Such compounds may be available in the soil by exudation or degradation of plant tissues (KOCAÇAHÇKAN *et al.*, 2009). Saponins easily interact with cell membranes, using Δ^5 sterols from the lipid bilayer as main targets (EECKHAUT *et al.*, 2015). This interaction affects membrane stability and permeability, and may evolve to a scenario of cell death (HOAGLAND *et al.*, 1996). In this work, ultrastructural analysis in *A. colubrina* roots pointed possible signals of cell death (chromatin degradation, accumulation of cellular wastes), which suggests interaction of REA saponins with target cells.

In summary, the phytotoxic activity shown by *U. humidicola* may contribute to its invasive potential, as well as to the problems observed in the ecological restoration with *A. colubrina* in the presence of *Urochloa* species. Bioassay-guided isolation study has allowed characterization of the major compounds present in the most active *U. humidicola* extract. Five of these compounds are described for the first time in the literature. The inhibitory effect of the extract of this plant on weeds open up the possibility

of studying the use of *U. humidicola* for weed control, inside the context of sustainable agriculture.

Table 3. ^1H NMR and ^{13}C Spectroscopic Data for the Aglycone Moieties of Compounds **4 -7** (MeOD) ^c

4^a		5^b		6^b		7^b		
no.	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} , mult (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1 _{ax}	1.14 (o)	40.3	1.13 (o)	40.3	1.09 (o)	40.0	1.04 (o)	39.5
1 _{ec}	2.62 dt (3.1, 3.4, 13.0)		2.60 dt (3.1, 3.2, 12.8)		2.60 dt (3.1, 3.2, 12.8)		2.75 dt (3.1, 3.2, 12.8)	
2 _{ax}	1.62 (o)	29.9	1.50 (o)	32.4	1.57 (o)	32.2	1.62 (o)	32.5
2 _{ec}			1.72 m					
3	3.58 (o)	79.9	3.38 m	72.6	3.60 (o)	72.6	3.35 (o)	72.6
4 _{ax}	2.29 dd (13.2, 2.6)	40.2	2.23 dd (13.2, 2.6)	43.3	2.24 dd (13.2, 2.5)	43.5	2.21 dd (13.1, 2.3)	43.7
4 _{ec}	2.42 dd (13.2, 13.2)							
5		142.5		142.7		142.8		143.1
6	5.43 brd (5.1)	122.4	5.39 brd (5.2)	122.2	5.40 brd (5.2)	121.9	5.37 brd (5.2)	121.9
7 _{ax}	1.56 (o)	33.1	1.56 (o)	33.0	1.50 (o)	33.1	1.57 (o)	33.3
7 _{ec}	1.98 dd (5.0)		2.01 dd (5.1)		2.01 dd (5.3)		2.00 dd (5.5)	
8	1.52 m	31.4	1.45 (o)	32.7	1.48 (o)	32.9	1.49 (o)	32.8
9	1.02 m	57.7	1.02 m	57.6	1.19 (o)	55.9	1.21 (o)	55.7
10		39.7		39.5		39.5		39.5
11	3.97 td (9.9, 9.9, 5.3)	69.2	3.98 td (10.0, 9.9, 5.3)	69.2	4.09 (10.0, 9.9, 5.3)	76.0	4.18 (10.0, 9.9, 5.3)	74.6
12 _{ax}	1.22 (o)	51.6	1.28 (o)	51.9	1.16 (o)	46.1	1.18 (o)	45.7
12 _{ec}	1.98 (o)		2.20 (o)		2.44 dd (9.9, 5.3)		2.42 dd (9.9, 5.3)	
13		41.9		43.6		42.9		42.8
14	1.23 m	56.9	1.02 m	54.8	1.04 (o)	54.7	1.06 (o)	54.7
15 _{ax}	1.28 m	30.8	1.43 (o)	37.3	1.45 (o)	37.3	1.43 (o)	37.4
15 _{ec}	1.85 m		2.21 (o)		2.22 (o)		2.21 (o)	
16	4.41 ddd (7.5, 7.6, 6.3)	82.3	4.09 ddd (4.5, 7.9, 7.9)	81.9	4.09 ddd (4.5, 7.9, 7.9)	81.9	4.09 ddd (4.5, 7.9, 7.9)	82.0
17	1.78 dd (6.8, 7.6)	63.5	1.82 dd (6.9, 7.9)	57.9	1.83 dd (6.9, 7.9)	58.0	1.82 dd	57.8
18	0.81 s	17.6	0.92 s	14.8	0.92 s	14.7	0.89 s	14.7
19	1.17 s	19.4	1.16 s	19.4	1.18 s	18.8	1.18 s	18.8
20	1.89 dq (6.8, 7.2)	42.9	3.09 (o)	44.9	3.09 (o)	44.8	3.09 (o)	44.9
21	0.96 d (7.2)	14.9	1.16 d (6.2)	17.0	1.16 d (6.2)	17.1	1.18 d (6.2)	17.1
22		110.5		218		217.9		218.1
23 _{ax}	1.70 dt (5.0, 13.4)	32.6	2.69 dt (6.0, 13.8)	39.4	2.68 dt (6.2, 13.7)	39.4	2.63 dt (6.2, 13.7)	39.7
23 _{ec}	1.55 br d (13.4)		2.71 dt (13.8)		2.77 dt (13.7)		2.77 dt (13.7)	
24 _{ax}	1.43 m	29.9	1.41 (o)	33.6	1.40 (o)	33.6	1.40 (o)	33.6
24 _{ec}	1.61 dt (5.0, 13.4)							
25	1.59 (o)	32.4	1.52 (o)	28.9	1.52 (o)	28.9	1.55 (o)	28.9
26 _{ax}	3.30 dd (10.4, 10.4)	67.9	0.89 d (5.9, 3H)	22.8	0.88 d (6.5, 3H)	23.1	0.88 d (6.4, 3H)	23.1
26 _{ec}	3.44 dd (3.7, 10.4)							
27	0.78 d (6.6)	17.5	0.89 d (5.9, 3H)	23.1	0.89 d (6.5, 3H)	22.8	0.89 d (6.4, 3H)	22.8

^aData were measured at 600 MHz (^1H NMR) and 150 MHz (^{13}C NMR). ^bData were measured at 500 MHz (^1H NMR) and 125 MHz (^{13}C NMR). ^cAssignments were confirmed by ^1H - ^1H -COSY, 1D-TOCSY, HSQC, and HMBC experiments. ^do: overlapped with other signals.

Table 4. ^1H NMR and ^{13}C Spectroscopic Data of the Sugar Portions of Compounds **4-7** (MeOD)^c

4^a		5^b		6^b		7^b		
no.	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}
	β - D-Glu		β - D-Glu		β - D-Glu		β - D-Glu	
1'	4.37 d (7.7)	102.4	3.92 d (7.6)	105.5	3.92 d (7.6)	105.5	3.91 d (7.6)	105.5
2'	3.13 dd (7.7, 8.8)	75.1	3.09 (o) dd (7.6, 9.3)	75.6	3.10 (o)	75.6	3.09 (o)	75.4
3'	3.32 dd (8.8, 7.9)	78.1	3.24 (o)	78.3	3.23 (o)	78.3	3.23 (o)	78.3
4'	3.25 dd (8.3, 7.9)	71.6	3.24 (o)	71.6	3.24 (o)	71.6	3.24 (o)	71.6
5'	3.15 m	77.9	3.16 m	77.8	3.15 m	77.8	3.15 m	77.8
6'a	3.84 dd (12, 2.4)	62.7	3.82 dd (12, 2.1)	62.8	3.81 dd (12, 2.2)	62.8	3.80 (o)	62.8
6'b	3.64 dd (12, 5.2)		3.62 dd (12, 5.1)		3.66 (o)		3.63 dd (11.8, 5.0)	
					β - D-Rha			
1''					4.88 sa	99.2		
2''					3.66 (o)	71.6		
3''					3.60 (o)	72.5		
4''					3.69 (o)	73.4		
5''					3.40 dd (9.5, 6.2)	72.6		
6''					1.22 d (6.2)	18.0		
							β - D-Xyl	
1''							4.30 d (7.9)	101.5
2''							3.09 dd (8.5, 7.9)	75.6
3''							3.27 d (8.5, 8.8)	78.1
4''							3.40 m	71.4
5a''							3.15 dd (11.2, 10.6)	67.1
5b''							3.84 dd (11.2, 5.2)	

^aData were measured at 600 MHz (^1H NMR) and 150 MHz (^{13}C NMR). ^bData were measured at 500 MHz (^1H NMR) and 125 MHz (^{13}C NMR). ^cAssignments were confirmed by ^1H - ^1H -COSY, 1D-TOCSY, HSQC, and HMBC experiments. ^do: overlapped with other signals.

References

- ALVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C.; DE MORAES GONÇALVES, J.L.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.
- ARANITI, F.; COSTAS-GIL, A.; CABEIRAS-FREIJANES, L.; LUPINI, A.; SUNSERI, F.; REIGOSA, M.J.; ABENAVOLI, M.R.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M. Rosmarinic acid induces programmed cell death in Arabidopsis seedlings through reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction. *Plos One*, v. 13, n. 12, p. e0208802, 2018.
- BAO, F.; ASSIS, M.A.; ARRUDA, R.; POTT, A. Effects of *Urochloa humidicola* on plant diversity in native grasslands in a neotropical wetland. *Wetlands*, v. 35, n. 5, p. 841–850, 2015.

- BERNARDI, A.C.C.; OLIVEIRA, P.P.A.; PRIMAVESI, O. Soil fertility of tropical intensively managed forage system for grazing cattle in Brazil. In: WHALEN, J. (Ed.). *Soil Fertility Improvement and Integrated Nutrient Management - A Global Perspective*. Rijeka: InTech, 2012. p. 37–56.
- BISPO, J.S.; COSTA, D.C.C.; GOMES, S.E.V.; OLIVEIRA, G.M.; MATIAS, J.R.; RIBEIRO, R.C.; DANTAS, B.F. Size and vigor of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan seeds harvested in Caatinga areas. *Journal of Seed Science*, v. 39, n. 4, p. 363–373, 2017.
- BURGOS, N.R.; TALBERT, R.E.; KIM, K.; KUK, Y.I. Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*). *Journal of Chemical Ecology*, v. 30, n. 3, p. 671–689, 2004.
- CALLAWAY, R.M.; RIDENOUR, W.M. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Frontiers in Ecology and the Environment*, v. 2, n. 8, p. 436–443, 2004.
- CÁRDENAS, D.M.; CALA, A.; MOLINILLO, J.M.G.; MACÍAS, F.A. Preparation and phytotoxicity study of lappalone from dehydrocostuslactone. *Phytochemistry Letters*, v. 20, p. 66–72, 2017.
- CASTELLANO, D. *Optimización de bioensayos alelopáticos: aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales*. Tese (Doutorado em Química Orgânica), Universidad de Cádiz, 2002. 562 f.
- CHON, S.U.; CHOI, S.-K.; JUNG, S.; JANG, H.G.; PYO, B.S.; KIM, S.M. Effects of alfalfa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfalfa and barnyard grass. *Crop Protection*, v. 21, n. 10, p. 1077–1082, 2002.
- CRUZ-ORTEGA, R.; ANAYA, A.L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B.E.; LAGUNA-HERNÁNDEZ, G. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 24, n. 12, p. 2039–2057, 1998.
- DA SILVA, B.P.; NEPOMUCENO, M.P.; VARELA, R.M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J.M.G.; ALVES, P.L.C.A.; MACÍAS, F.A. Phytotoxicity study on *Bidens sulphurea* Sch. Bip. as a preliminary approach for weed control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, n. 25, p. 5161–5172, 2017.
- DA SILVA, L.M.I.; DA SILVA, M.J.; ROCHA, J.S.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J.A.; STOLF-MOREIRA, R.; OLIVEIRA, H.C. Potential allelopathic effect of *Brachiaria*

- decumbens* root exudates on neotropical tree seedlings. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, v. 29, n. 4, p. 177–186, 2017.
- DE FARIA, A.P.; FERNANDES, G.W.; FRANÇA, M.G.C. Physiological approaches to determine the impact of climate changes on invasive African grasses in the savanna ecoregion of Brazil. *Environmental Earth Sciences*, v. 74, n. 4, p. 3077–3088, 2015.
- DURÁN, A.G.; CHINCHILLA, N.; MOLINILLO, J.M.G.; MACÍAS, F.A. Structure-activity relationship studies on naphthoquinone analogs. The search for new herbicides based on natural products. *Pest Management Science*, v. 75, n. 9, p. 2517–2529, 2019.
- EECKHAUT, I.; CAULIER, G.; BRASSEUR, L.; FLAMMANG, P.; GERBAUX, P.; PARMENTIER, E. Effects of holothuroid ichthyotoxic saponins on the gills of free-living fishes and symbiotic pearlfishes. *Biological Bulletin*, v. 228, n. 3, p. 253–265, 2015.
- FEITOZA, R.B.B.; LIMA, H.R.P.; OLIVEIRA, E.A.G.; OLIVEIRA, D.R.; MORAES, L.F.D.; OLIVEIRA, A.E.A.; CARVALHO, M.G.; DA CUNHA, M. Structural and ultrastructural variations in roots of *Calopogonium mucunoides* Desv. treated with phenolic compounds from *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga and phenolic commercial standards. *South African Journal of Botany*, v. 116, p. 142–149, 2018.
- FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, Edição Especial, p. 175–204, 2000.
- GRAÑA, E.; COSTAS-GIL, A.; LONGUEIRA, S.; CELEIRO, M.; TEIJEIRA, M.; REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M. Auxin-like effects of the natural coumarin scopoletin on *Arabidopsis* cell structure and morphology. *Journal of Plant Physiology*, v. 218, p. 45–55, 2017.
- HOAGLAND, R.E.; ZABLOTOWICZ, R.M.; REDDY, K.N. Studies on the phytotoxicity of saponins on weed and crop plants. In: WALLER G.R.; YAMASAKI K. *Saponins Used in Food and Agriculture*. Boston: Springer, 1996. p. 57–73.
- IAS - INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY. *Constitution and bylaw of IAS*. Cádiz: IAS Newsletter, 1996.
- INMET. Rede de Estações Climatológicas. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/index>>.
- KOCAÇAĞKAN, I.; CÜNEYT UNVER, M.; TERZI, M. Effects of saponin allelochemical on amylase and polyphenol oxidase enzyme activities during

- germination of wheat seeds (*Triticum durum* cv. Altar). *Fresenius Environmental Bulletin*, v. 18, n. 3, p. 249–252, 2009.
- MACÍAS, F.A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J.M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 6, p. 2512–2521, 2000.
- MAHATO, S.B.; SAHU, N.P.; GANGULY, A.N. Steroidal saponins from *Dioscorea floribunda*: Structures of floribundasaponins A and B. *Phytochemistry*, v. 20, n. 8, p. 1943–1946, 1981.
- MOTA, G.S.; SARTORI, C.J.; MIRANDA, I.; QUILHÓ, T.; MORI, F.A.; PEREIRA, H. Bark anatomy, chemical composition and ethanol-water extract composition of *Anadenanthera peregrina* and *Anadenanthera colubrina*. *PLoS ONE*, v. 12, n. 12, e0189263, 2017.
- NAKAMURA, T.; KANNO, T.; MIRANDA, C.H.B.; OHWAKI, Y.; MACEDO, M.C.M. Characterization of nitrogen utilization by tropical grasses (*Brachiaria* species) in the Brazilian savannas. *JIRCAS Research Highlights*, v. 61, n. 7, p. 20–21, 1998.
- NEPOMUCENO, M.; CHINCHILLA, N.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; LACRET, R.; ALVES, P.L.C.A.; MACIAS, F.A. Chemical evidence for the effect of *Urochloa ruziziensis* on glyphosate-resistant soybeans. *Pest Management Science*, v. 73, n. 10, p. 2071–2078, 2017.
- NITSCH, J.P.; NITSCH, C. Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins. *Plant Physiology*, v. 31, n. 2, p. 94–111, 1956.
- OLESZEK, W. Allelopathic potentials of alfalfa (*Medicago sativa*) saponins: Their relation to antifungal and hemolytic activities. *Journal of Chemical Ecology*, v. 19, n. 6, p. 1063–1074, 1993.
- OLIVEIRA, A.P.P.; PEREIRA, S.R.; CÂNDIDO, A.C.S.; LAURA, V.A.; PERES, M.T.L.P. Can allelopathic grasses limit seed germination and seedling growth of Mutambo? A test with two species of *Brachiaria* grasses. *Planta Daninha*, v. 34, n. 4, p. 639–648, 2016.
- OLIVEIRA, D.R.; NEPOMUCENO, D.D.; CASTRO, R.N.; BRAZ FILHO, R.; CARVALHO, M.G. Special metabolites isolated from *Urochloa humidicola* (Poaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, n. 2, p. 789–797, 2017.
- ONO, M.; TAKAMURA, C.; SUGITA, F.; MASUOKA, C.; YOSHIMITSU, H.;

- IKEDA, T.; NOHARA, T. Two new steroid glycosides and a new sesquiterpenoid glycoside from the underground parts of *Trillium kamtschaticum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 55, n. 4, p. 551–556, 2007.
- PEREIRA, L.A.R.; PINA, G.O.; SILVEIRA, C.E.S.; GOMES, S.M.; TOLEDO, J.L.; BORGHETTI, F. Effects of *Eugenia dysenterica* L. extracts on roots and gravitropism of *Sesamum indicum* L. and *Raphanus sativus* L. *Allelopathy Journal*, v. 42, n. 1, p. 3–20, 2017.
- PIRES, V.S.; TAKETA, A.T.C.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Saponins and saponinins from *Brachiaria decumbens* Stapf. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 13, n. 2, p. 135–139, 2002.
- POÓR, P.; PATYI, G.; TAKÁCS, Z.; SZEKERES, A.; BÓDI, N.; BAGYÁNSZKI, M.; TARI, I. Salicylic acid-induced ROS production by mitochondrial electron transport chain depends on the activity of mitochondrial hexokinases in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Plant Research*, v. 132, n. 2, p. 273–283, 2019.
- RIBEIRO, R.C.; DE CARVALHO, M.G.; LOPES, H.M.; ROSSIELLO, R.O.P.; BARBIERI JUNIOR, E. allelopathic activity of the hydrolate and water decoction of *Brachiaria humidicola* (Rendle) plant parts on the germination of four tropical leguminous species. *ISRN Agronomy*, v. 2012, p. 1–6, 2012.
- RIBEIRO, R.C.; FEITOZA, R.B.B.; LIMA, H.R.P.; CARVALHO, M.G. Phytotoxic effects of phenolic compounds on *Calopogonium mucunoides* (Fabaceae) roots. *Australian Journal of Botany*, v. 63, n. 8, p. 679–686, 2015.
- SANTOS, L.S.; SANTOS, J.C.L.; SOUZA FILHO, A.P.S.; CORRÊA, M.J.C.; VEIGA, T.A.M.; FREITAS, V.C.M.; FERREIRA, I.C.S.; GONÇALVES, N.S.; SILVA, C.E.; GUILHON, G.M.S.P. Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas do Capim-Marandu e suas variações em função do pH. *Planta Daninha*, v. 26, n. 3, p. 531–538, 2008.
- SANTOS, W.D.; FERRARESE, M.L.L.; NAKAMURA, C.V.; MOURÃO, K.S.M.; MANGOLIN, C.A.; FERRARESE-FILHO, O. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. the possible mode of action. *Journal of Chemical Ecology*, v. 34, n. 9, p. 1230–1241, 2008.
- SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Autotoxicity: Concept, organisms, and ecological significance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 18, n. 6, p. 757–772, 1999.
- SOUZA, F.H.D.; VERZIGNASSI, J.R.; PERES, R.M.; COUTINHO FILHO, J.L.V.;

- JUSTO, C.L. *Produção comercial de sementes de Brachiaria (syn. Urochloa) humidicola no Brasil*. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2016, 43p.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; PEREIRA, A.A.G.; BAYMA, J.C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. *Planta Daninha*, v. 23, n. 1, p. 25–32, 2005.
- SOUZA-ALONSO, P.; RODRÍGUEZ, J.; GONZÁLEZ, L.; LORENZO, P. Here to stay. Recent advances and perspectives about *Acacia* invasion in Mediterranean areas. *Annals of Forest Science*, v. 74, n. 3, p. 0–20, 2017.
- SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M.P.; ONO, H.; MORETA, D.E.; SALCEDO, A.F.; YOSHIHASHI, A.T.; ISHIKAWA, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I.M.; LASCANO, C.E.; BERRY, W.L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 41, p. 17302–17307, 2009.
- SULLIVAN, C.A.O.; WHISSON, K.; TREBLE, K.; ROPER, M.M.; MICIN, S.F.; WARD, P.R. Biological nitrification inhibition by weeds: Wild radish, brome grass, wild oats and annual ryegrass decrease nitrification rates in their rhizospheres. *Crop and Pasture Science*, v. 68, n. 8, p. 798–804, 2017.
- VIEIRA, E.A.; ANDRADE GALVÃO, F.C.; BARROS, A.L. Influence of water limitation on the competitive interaction between two Cerrado species and the invasive grass *Brachiaria brizantha* cv. Piatã. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 135, p. 206–214, 2019.
- WANG, Y.; LI, C.; WANG, Q.; WANG, H.; DUAN, B.; ZHANG, G. Environmental behaviors of phenolic acids dominated their rhizodeposition in boreal poplar plantation forest soils. *Journal of Soils and Sediments*, v. 16, n. 7, p. 1858–1870, 2016.
- YANG, G.Q.; WAN, F.H.; GUO, J.Y.; LIU, W.X. Cellular and ultrastructural changes in the seedling roots of upland rice (*Oryza sativa*) under the stress of two allelochemicals from *Ageratina adenophora*. *Weed Biology and Management*, v. 11, n. 3, p. 152–159, 2011.
- YUAN, Z.; ZHENG, X.; ZHAO, Y.; LIU, Y.; ZHOU, S.; WEI, C.; HU, Y.; SHAO, H. Phytotoxic compounds isolated from leaves of the invasive weed *Xanthium spinosum*. *Molecules*, v. 23, n. 11, p. 2840, 2018.

CAPÍTULO 3

(Este capítulo será submetido ao periódico Journal of Chemical Ecology)

Avaliações fisiológicas do potencial fitotóxico do extrato de raízes de *Urochloa humidicola* (Rendle.) Morrone & Zuloaga sobre o desenvolvimento de plântulas de gergelim

Rodrigo Barbosa Braga Feitoza¹, Helena Regina Pinto Lima², Luiz Fernando Duarte de Moraes³, Heitor Monteiro Duarte⁴, Maura Da Cunha¹

¹ Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ.

² Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23897-000, Seropédica, RJ

³ EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, 23891-000, Seropédica, RJ.

⁴ Núcleo de Estudos em Ecologia e Desenvolvimento Socioambiental de Macaé, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 27965-045, Macaé, RJ.

Resumo

Análises da fisiologia radicular e da fotossíntese podem indicar os modos de ação de substâncias fitotóxicas sobre as plantas-alvo. As raízes da gramínea exótica *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga (Poaceae) produzem diferentes metabólitos especiais, incluindo saponinas esteroídicas e diterpenoides, cujos mecanismos de ação necessitam de maior investigação. Este estudo visa avaliar o efeito fitotóxico a partir do extrato das raízes de *U. humidicola* sobre gergelim, por meio de parâmetros fisiológicos relativos ao ambiente da rizosfera e etapas do processo fotossintético. A fração acetato de etila do extrato aquoso de raízes de *U. humidicola* (RAE) foi recolhida para bioensaios. Sementes de gergelim foram germinadas em placas de 24 poços sob os tratamentos controle, usando água destilada, e RAE, nas concentrações de 125 a 2000 ppm. O experimento foi conduzido em câmaras de germinação a 25 °C e fotoperíodo 12/12 h. A fluorescência da clorofila dos cotilédones do gergelim foi analisada com uso de mini-PAM e sistema de imagens próprio para avaliação da eficiência quântica potencial (F_v/F_m) e efetiva do fotossistema II (Φ_{PSII}), bem como dos parâmetros ETR_m, E_k e α da curva de resposta à luz. Ao final do bioensaio, indivíduos foram transplantados para meio ágar com bromocresol púrpura, e foi avaliado o pH da rizosfera. O extrato RAE inibiu significativamente o comprimento radicular e caulinar a partir de 1.000 ppm. Esse mesmo tratamento reduziu a acidificação da rizosfera, sugerindo menor atividade de alongamento celular. A Φ_{PSII} foi reduzida após tratamento com RAE 1.000 ppm, enquanto F_v/F_m não apresentou quaisquer alterações. Esses resultados indicam maior interferência do extrato sobre a cadeia de transporte de elétrons do que no próprio fotossistema. O aumento de ETR_m e E_k sugere um ajuste breve da planta ao estresse causado pelo extrato. Esses resultados sugerem a ação das saponinas sobre a permeabilidade da membrana, afetando o potencial de membrana das raízes e o transporte de elétrons pelas membranas dos tilacoides.

Palavras-chave: *Brachiaria*, Fotossíntese, H⁺-ATPase, Saponinas Esteroídicas.

Introdução

O uso de gramíneas forrageiras exóticas para formação de pastagens em diferentes partes do mundo foi realizado indiscriminadamente, considerando somente aspectos produtivos de curto prazo e a adaptabilidade dessas culturas ao novo ambiente. No Brasil, as espécies do gênero *Urochloa* P. Beauv. (Poaceae) ocupam cerca de 95 milhões de hectares, na maioria das fitofisionomias brasileiras, exigindo atenção tanto sob o aspecto agrícola, quanto no manejo de áreas degradadas ocupadas por essas espécies (FERREIRA *et al.*, 2010; THOMAS *et al.*, 2019).

Urochloa humidicola (Rendle) Morrone & Zuloaga, após se adaptar bem a solos pobres em nutrientes e de baixa drenagem, ocupa aproximadamente 10 milhões de hectares de pastagens (IBGE, 2006; BAO *et al.*, 2015). Tal espécie, a exemplo de outras espécies de *Urochloa*, assumem *status* de invasoras conforme aumentam sua área de cobertura sobre as espécies nativas (RIBEIRO *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2016).

As espécies de *Urochloa* são produtoras de substâncias fitotóxicas, as quais podem interferir no estabelecimento de outras plantas vizinhas (MARTINS *et al.*, 2006; KATO-NOGUCHI *et al.*, 2014). A partir dessas espécies foram isolados e identificados ácidos fenólicos, flavonoides, triterpenoides e saponinas esteroídicas (PIRES *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2008; PÉREZ *et al.*, 2016). Nas raízes de *U. humidicola* foram detectadas substâncias fenólicas como o ácido *p*-cumárico e a catequina-7-O-glicosídeo, o diterpenoide brachialactona, e saponinas esteroídicas como a dioscina (GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2007; SUBBARAO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Embora nos últimos 10 anos, trabalhos mais recentes tenham identificado possíveis aleloquímicos nas partes aéreas (SOUZA FILHO *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2018; FEITOZA *et al.*, 2018), poucos são os trabalhos que avaliaram o potencial fitotóxico das raízes de *U. humidicola* ou das substâncias encontradas em seus extratos e exsudatos. Além disso, tais trabalhos se limitaram a avaliações da germinação de sementes e do alongamento radicular ou caulinar (SENARATHNE *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2012).

Diferentes classes de metabólitos especiais podem apresentar modos de ação distintos sobre as plantas-alvo, refletindo no retardo do desenvolvimento das mesmas (REIGOSA *et al.*, 2013; MACÍAS *et al.*, 2019). A inibição no desenvolvimento radicular ou caulinar pode ser um reflexo de fatores, como o desbalanço hormonal, a inibição da divisão ou do alongamento celular, as alterações na permeabilidade de membrana e menor potencial hídrico (EINHELLIG, 2004; DE ANDRADE SANTIAGO *et al.*, 2017;

MACÍAS *et al.*, 2019). Dentre os diferentes fitormônios responsáveis pelo desenvolvimento do corpo da planta, as auxinas participam na regulação do desenvolvimento radicular, com a formação de raízes laterais, com o alongamento celular, e com a diferenciação dos tecidos vasculares da raiz (ALONI *et al.*, 2006). Diferentes substâncias fitotóxicas podem interferir nos teores das auxinas nas plantas, seja por estimular a degradação desses fitormônios, ou por interferir no seu transporte (TOMASZEWSKIL & THIMANN, 1966; CHEYNIER *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2015).

A fotossíntese é um processo metabólico sujeito a influências do meio biótico e abiótico, e é alvo de agentes fitotóxicos de diferentes classes. Ademais, as folhas cotiledonares e verdadeiras necessitam desenvolver uma plasticidade para aclimação aos variados tipos de estresse, sejam esses diretos ou indiretos (DAYAN *et al.*, 2009). Nesse sentido, os metabólitos especiais podem afetar a fotossíntese por três vias principais: no sistema de trocas gasosas, na cadeia de transporte fotossintético de elétrons, e no ciclo de redução do carbono (ZHOU & YU, 2006). Devido a isso, cada vez mais estudos têm investigado alterações nos diferentes parâmetros fotossintéticos para avaliar o efeito fitotóxico de diferentes classes de substâncias (HUSSAIN *et al.*, 2011; HUSSAIN & REIGOSA, 2011; WANG *et al.*, 2014).

O fotossistema II (PSII) é um complexo de proteína integral de membrana que, ao receber energia na forma de luz, participa na cadeia fotossintética de elétrons ao reduzir a plastoquinona e oxidar moléculas de água em O₂ (TAIZ & ZEIGER, 2013). A transferência de elétrons entre os fotossistemas I e II gera produtos importantes para as etapas posteriores da fotossíntese, como ATP e NADPH. O PSII é considerado sítio de ação de diferentes classes de substâncias fitotóxicas, pois podem bloquear a cadeia transportadora e levar à fotoinibição (CHENG & CHENG, 2015). Além disso, alterações na fotoquímica do PSII costumam ser observadas em resposta a estresses bióticos e abióticos, de modo que se torna um parâmetro interessante para diagnóstico de atividade alelopática (PUIG *et al.*, 2018).

Este trabalho visou avaliar o efeito do extrato de raízes de *U. humidicola* sobre o desenvolvimento de plântulas de gergelim, por meio de parâmetros fisiológicos relativos ao ambiente da rizosfera, e etapas do processo fotossintético. Foram avaliados o efeito do extrato sobre o crescimento inicial, a acidificação da rizosfera dependente de H⁺-ATPase de membrana, e os diferentes parâmetros fotossintéticos derivados de medições da fluorescência da clorofila.

Materiais e Métodos

Área de Estudo e Coleta de Material Botânico

Raízes de *U. humidicola* foram coletadas a partir de indivíduos em estágio vegetativo, localizados em área de pastagem, com monodominância de *U. humidicola* no Setor de Caprinocultura do Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil (coordenadas 22° 46' S; 43° 40' W; altitude 33 m). O clima local é reconhecido como Aw (ALVARES *et al.*, 2013). A região apresenta temperatura média anual de 23,8 °C, e a precipitação total ao longo do ano de 2018 foi de 1192 mm (INMET, 2018). O material botânico foi herborizado e depositado no herbário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ (RBR) sob o número 46249.

Obtenção do Extrato Radicular

As raízes foram secas em estufa de circulação forçada com temperatura de 50 °C até peso constante, e depois trituradas em moinho de rotor tipo ciclone (TECNAL TE-625, Piracicaba, Brasil), obtendo-se 2,23 kg de material pulverizado. O material triturado foi submetido à extração com água destilada (1:10 m/v) em aparelho ultrassônico durante dois períodos de 15 min, obtendo-se um extrato aquoso bruto. Tal extrato foi submetido a uma extração líquido-líquido (1:1 v/v) com acetato de etila (VWR International, Radnor, EUA). Esse procedimento foi repetido três vezes, e gerou duas frações: um resto aquoso, e a fração acetato de etila (RAE). Retirou-se o solvente do extrato RAE com o uso de um rotaevaporador, e o extrato foi armazenado para a etapa seguinte.

Bioensaio de Fitotoxicidez

O extrato RAE foi dissolvido inicialmente em DMSO 0,1% (5 µL por mL de água destilada), e posteriormente em água destilada, obtendo as concentrações de 2000, 1000, 500, 250 e 125 ppm, mantendo a proporção de DMSO para todos os tratamentos. O controle consistiu em água destilada, também com adição de DMSO na proporção acima. O bioensaio foi conduzido em placas de cultura com 24 poços (4 linhas x 6 colunas), com fundo de papel filtro Whatman n° 1. Cada placa consistiu em uma repetição, sendo adotadas oito repetições ao todo. Cada coluna, nas oito placas, consistiu em um tratamento (controle + cinco diluições do extrato REA), sendo adicionados 280 µL de tratamento por poço. Como espécie-alvo, foram adotadas sementes de gergelim-preto

(*Sesamum indicum* L.). Cada poço recebeu somente uma semente. Feita a distribuição, as placas foram identificadas, lacradas com Parafilm[®], e mantidas durante nove dias em câmara tipo B.O.D., a 25 °C e fotoperíodo 12/12 h. Ao final do bioensaio, os indivíduos germinados (n=24) foram fotografados e mensurados com auxílio do *plugin* Smart Root 4.1 presente no software Image J 1.48v (LOBET *et al.*, 2011).

Avaliação do pH Rizosférico

Após o 7º dia de bioensaio, foram selecionados seis indivíduos controle e seis do tratamento RAE 1000 ppm, transplantados para placas de seis poços, com fundo de 5 mm de ágar 1,0%, CaSO₄ 10 mM e indicador bromocresol púrpura 0,03% (m/v; pH 6,5) (ZANDONADI *et al.*, 2010). A alteração da cor púrpura para amarelo corresponde à região acidificada pelas raízes (pH < 6,0). As imagens foram obtidas após 24 h de incubação. O pH foi quantificado diretamente no gel através de uma sonda ao longo da rizosfera a cada 12 mm (ZANDONADI *et al.*, 2016).

Fluorometria PAM

Com o intuito de avaliar a performance fotossintética de cotilédones de gergelim (n=24), utilizou-se um fluorímetro portátil de luz modulada Mini-PAM (Walz, Effeltrich, Alemanha) A eficiência quântica potencial do fotossistema II – FSII (F_v/F_m) foi mensurada em três momentos: no 7º dia de bioensaio (Dia 1; 12:00 h), no 8º (Dia 2; 16:00 h) e no 9º (Dia 3; 8:00 h). Para os Dias 1 e 2, as placas foram deixadas no escuro por 20 min para adaptação, enquanto para o Dia 3 o tempo de adaptação ao escuro foi de 12 h. F_v corresponde à variação de fluorescência de uma folha adaptada ao escuro, enquanto F_m é a fluorescência máxima após emissão de pulso de saturação de luz (CASTRO *et al.*, 2016).

A partir das seis placas de 24 poços restantes (n=24), foram obtidas curvas de resposta da eficiência quântica efetiva do FSII ($\Delta F/F_m'$) à luz, com auxílio da programação interna do Mini-PAM, onde $\Delta F = F_m' - F'$. Nessa, uma medida inicial de $\Delta F/F_m'$ foi obtida com radiação fotossinteticamente ativa (RFA) menor que 1 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, seguida de oito etapas subsequentes de 30 s cada, onde a intensidade da luz aumentou progressivamente até 1844 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A taxa de transporte de elétrons (ETR) foi estimada através da fórmula $0,5 \times 0,84 \times \Delta F/F_m' \times \text{RFA}$. Nesse cálculo, foi assumida a distribuição igualitária de energia entre os fotossistemas I e II (0,5) e 84% de

absortância da luz incidente pela amostra (0,84). A análise de regressão das curvas de RFA x ETR possibilitou a obtenção dos seguintes parâmetros: ETR_m (taxa máxima de transporte de elétrons), α (taxa inicial de aumento de ETR em função de RFA, que corresponde à inclinação da curva em função do eixo x), e E_k (irradiância mínima de saturação de ETR) (RALPH & GADEMANN, 2005; CASTRO *et al.*, 2016).

Imagens da eficiência quântica efetiva do FSII

Para as mensurações da eficiência quântica efetiva do FSII (Φ_{FSII}), duas das placas de 24 poços (n=8) foram selecionadas aleatoriamente e submetidas a um sistema de imagens da fluorescência da clorofila, desenvolvido no NUPEM/UFRJ (Macaé, RJ), ao longo do 8º e 9º dias de bioensaio (SUDATTI *et al.*, 2016). Amostras foram mantidas em fotoperíodo 12/12 h (luz/escuro) e intensidade de $102 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A Φ_{FSII} foi calculada por $(Fm' - F)/Fm'$, onde F representa a fluorescência emitida pelas amostras adaptadas à luz actínica, e Fm' é a fluorescência máxima após emissão de pulso de saturação de luz (GENTY *et al.*, 1989). Tanto a luz actínica (F) como a de pulso de saturação (Fm') foram emitidas por quatro iluminadores de 36 LEDs cada (*Light Emitting Diodes*, $\lambda = 470 \text{ nm}$, potência máxima 432 Watts). A intensidade da luz foi controlada via modulação por largura de pulso a uma frequência de 1200 Hz, onde a RFA foi mantida constante em $102 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Durante a emiss\u00e3o da luz azul, a fluoresc\u00eancia da clorofila foi detectada de forma seletiva por uma c\u00e2mera digital Alta U6 (Apogee, EUA) equipada com um sensor CCD de 1024 x 1024 pixels e digitaliza\u00e7\u00e3o a 16 bits. Na lente objetiva da c\u00e2mera (lente macro 60 mm, Nikkor, EUA) foi acoplado um filtro $\lambda < 655$ Schott (Mainz, Alemanha). As imagens foram processadas em um software espec\u00edfico de computador. A Φ_{FSII} foi avaliada segundo o m\u00e9todo de pulso de luz de saturação (SCHREIBER *et al.*, 1995), utilizando duas imagens: a primeira (iF), obtida sob luz act\u00ednica constante; a segunda (iFm), ap\u00f3s pulso de luz de saturação (intensidade $> 2500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com dura\u00e7\u00e3o de 800 ms). Tanto iF quanto iFm foram corrigidas ao dividi-las pela m\u00e9dia de pixels de um padr\u00e3o de fluoresc\u00eancia interno nas imagens, colocado pr\u00f3ximo \u00e0s amostras. Imagens de $i\Phi_{FSII}$ foram calculadas como $i\Phi_{FSII} = (iFm - iF) / (iFm)$, e salvas em formato de n\u00famero real (ponto flutuante). Noventa e quatro imagens de $i\Phi_{FSII}$ foram obtidas para dois per\u00edodos diurnos consecutivos de 12 h (8º e 9º dia de bioensaio), com intervalos de 15 min entre elas. A an\u00e1lise e processamento das imagens e obten\u00e7\u00e3o dos

valores médios de cada amostra individual foram realizadas no software ImageJ (SCHNEIDER *et al.*, 2012), considerando somente os cotilédones.

Análises Estatísticas

Os dados quantitativos referentes ao comprimento total e da raiz foram utilizados para o cálculo da Porcentagem de Inibição, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%inibição = \left(\frac{\bar{X}T - \bar{X}C}{\bar{X}C} \right) 100,$$

onde $\bar{X}T$ representa a média do alongamento de cada tratamento, e $\bar{X}C$ a média do alongamento no controle positivo. Os dados são expressos em porcentagem.

As análises estatísticas dos valores de comprimento, das leituras de pH rizosférico, e dos parâmetros fotossintéticos avaliados foram realizadas através do software R 3.6.1v (R CORE TEAM, 2019). A normalidade das amostras foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) (SHAPIRO & WILK, 1965). Para comparação entre os tratamentos nos diferentes parâmetros, foram adotados os seguintes procedimentos: Análise de Variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$) (TUKEY, 1949), para dados paramétricos; e o teste t de Wilcoxon (WILCOXON, 1945), para dados não-paramétricos.

Resultados

A Figura 1 mostra o efeito do extrato acetato de etila de raízes de *Urochloa humidicola* (RAE) sobre o desenvolvimento inicial dos indivíduos de gergelim, após nove dias de bioensaio. O extrato RAE apresentou tendência à redução no crescimento dos indivíduos de gergelim em todas as concentrações testadas, com exceção da concentração de 250 ppm, que estimulou o alongamento do caule. A inibição do crescimento do gergelim foi significativa ($p > 0,01$) sob a concentração de 2000 ppm (raiz: $0,29 \pm 0,12$ cm; caule: $0,04 \pm 0,10$ cm; total: $0,32 \pm 0,14$ cm), em comparação com os indivíduos controle (raiz: $1,49 \pm 0,26$ cm; caule: $0,36 \pm 0,07$ cm; total: $1,85 \pm 0,38$ cm).

Após seis dias submetidos aos distintos tratamentos, os indivíduos controles e RAE 1000 ppm foram transportados para placas com meio ágar contendo púrpura de bromocresol como indicador de pH. Após 24 h, o pH da região próxima às raízes foi avaliado e comparado entre os tratamentos (Figura 2). Os indivíduos controles apresentaram rizosfera mais acidificada em comparação aos indivíduos tratados com o extrato. Essa diferença foi observada com a mudança da cor do substrato, do roxo ao

amarelo na região próxima às raízes, indicando pH mais ácido (Figura 2A). As mensurações do pH rizosférico para cada tratamento apresentaram diferenças estatísticas (Figura 2B).

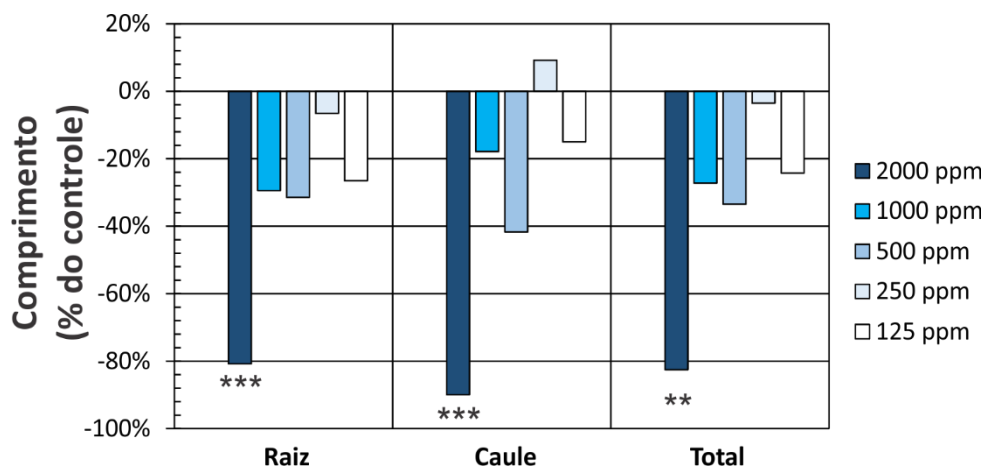


Figura 1: Efeito do extrato acetato de etila de raízes de *Urochloa humidicola* (RAE) sobre o comprimento radicular, caulinar e total de indivíduos de gergelim (n=24). Dados estão expressos como percentual de variação em relação ao controle. (**) e (***) representam diferenças significativas após realização de teste de Wilcoxon ($p < 0,01$ e $0,001$, respectivamente).

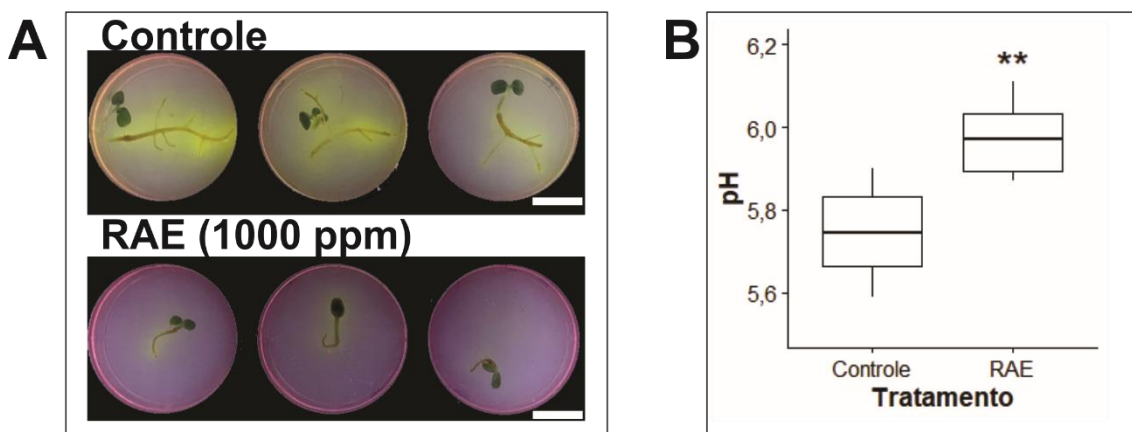


Figura 2. Avaliação do pH rizosférico de indivíduos de gergelim após tratamento com o extrato acetato de etila de raízes de *Urochloa humidicola* (RAE), na concentração de 1000 ppm. A. Aspecto geral dos indivíduos controle e RAE, após 24 h em meio ágar com o indicador de pH púrpura de bromocresol. A cor amarela indica pH ácido, enquanto a cor roxa indica tendência a pH mais alcalino. B. Boxplot do pH em função do tratamento (n=6). (**) indica diferença estatística após teste t de Welch ($p < 0,01$).

A eficiência quântica potencial do fotossistema II - FSII (F_v/F_m) dos cotilédones do gergelim foi avaliada para todos os tratamentos, após diferentes períodos de aclimação ao escuro (Figura 3). Após três avaliações distintas, os valores de F_v/F_m se mantiveram próximos a 0,80 tanto nos indivíduos controle, quanto naqueles tratados com

RAE. Esses valores indicam que o PSII não sofreu desativação após tratamento com o extrato RAE.

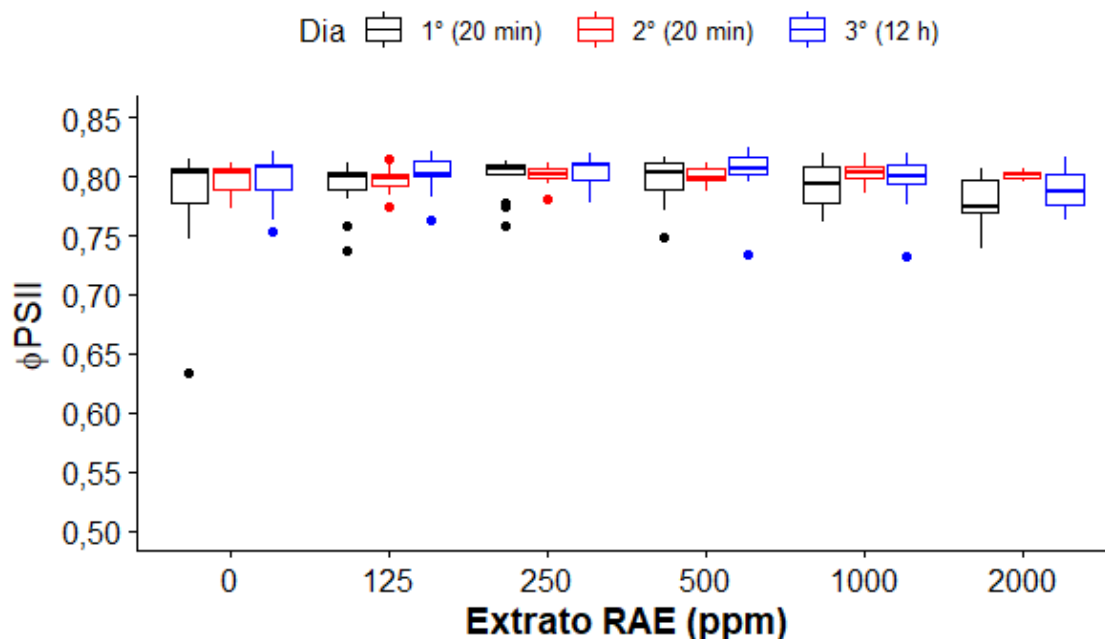


Figura 3: Valores da eficiência quântica potencial do FSII (F_v/F_m) de cotilédones de gergelim tratados com o extrato acetato de etila de raízes de *Urochloa humidicola* (n=24).

A avaliação da eficiência quântica efetiva do FSII (Φ_{FSII}) dos cotilédones de indivíduos de gergelim foi conduzida ao longo de dois dias de cultivo (Figuras 4 e 5). Todos os tratamentos apresentaram um aumento da Φ_{FSII} durante a primeira hora de exposição à luz, nos dois dias, atingindo seu valor mais alto após 4 h na maioria dos tratamentos. A partir desse período, os valores de Φ_{FSII} apresentaram leve decréscimo ou se mantiveram estáveis até o final do período de exposição à luz (Figura 4).

Os valores de Φ_{FSII} , avaliados após 4 h de exposição à luz, indicaram tendência de queda nas concentrações de 1000 e 2000 ppm do extrato RAE (Figura 5). No primeiro dia de avaliação, o extrato a 1000 ppm causou redução significativa do Φ_{FSII} em comparação ao controle (Figura 5A). Os valores de Φ_{FSII} foram menores no segundo dia de exposição à luz, em comparação com o primeiro dia, não sendo observado efeito estatisticamente significativo dos tratamentos avaliados por todo esse período (Figura 5B).

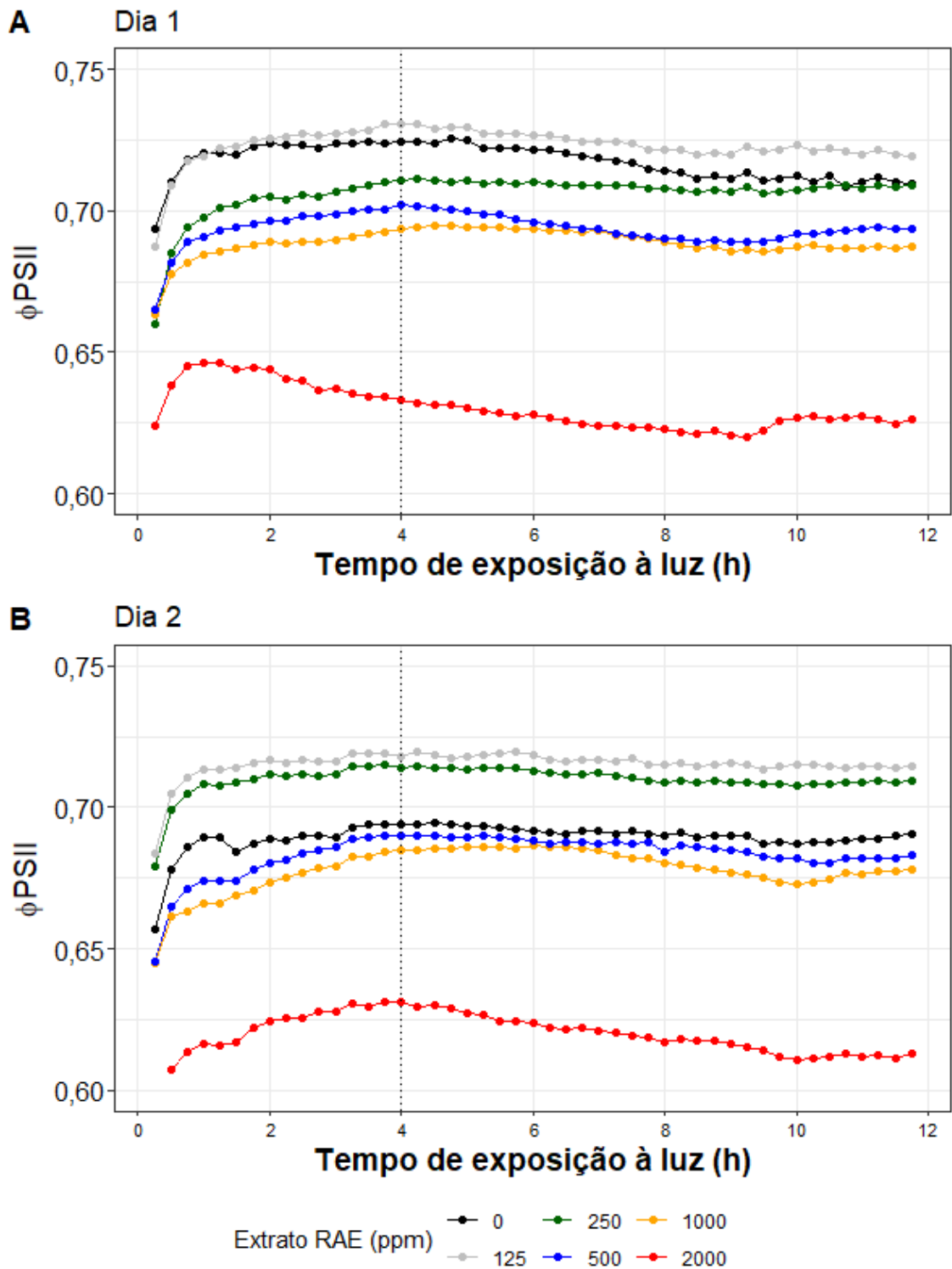


Figura 4: Efeito da concentração do extrato de raízes de *Urochloa humidicola* em acetato de etila sobre o curso diurno da eficiência quântica efetiva do FSII (Φ_{FSII}) em cotilédones de gergelim durante dois dias de medição. Os pontos correspondem ao valor médio de Φ_{FSII} das amostras para cada tratamento. Φ_{FSII} foi determinado sob irradiância de $102 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A linha tracejada (---) indica Φ_{FSII} máximo, utilizado como referência para comparação entre os tratamentos.

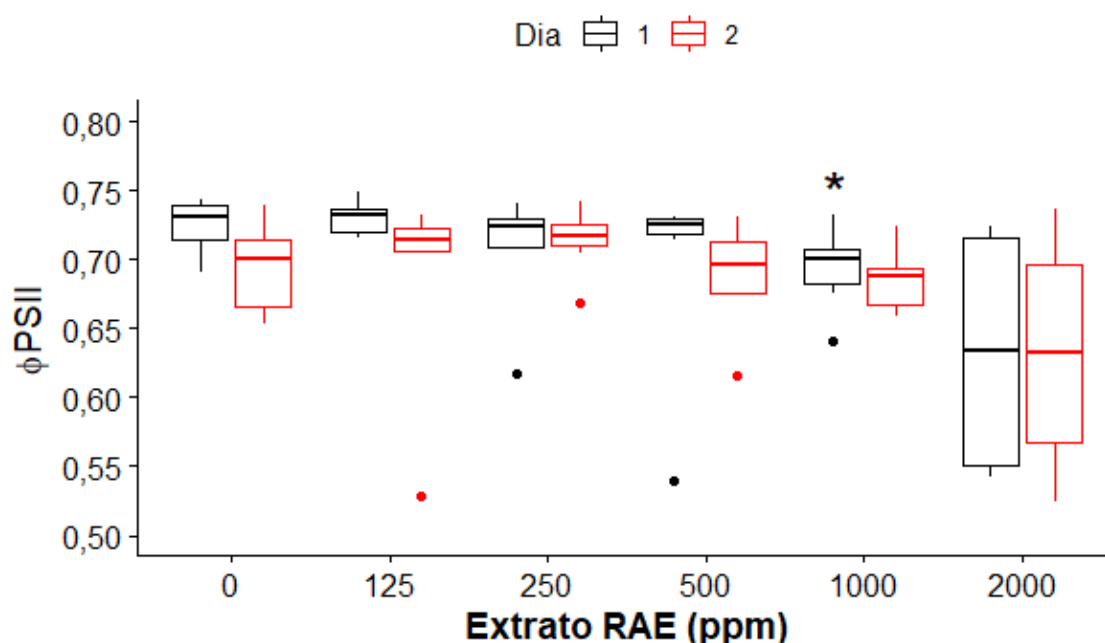


Figura 5: Efeito da concentração do extrato de raízes de *Urochloa humidicola* em acetato de etila sobre a eficiência quântica efetiva do FSII (Φ_{PSII}) em cotilédones de gergelim após 4 horas de exposição à luz. Os pontos correspondem ao valor médio dos pixels em cada amostra. Φ_{PSII} foi determinado sob irradiância de $102 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (*) indica diferença significativa com relação ao controle após teste *t* de Wilcoxon ($p < 0,05$).

Os parâmetros resultantes das curvas de resposta rápida à luz, ETR_m (taxa máxima de transporte de elétrons), α (aumento inicial da curva, proporcional à eficiência de captura da luz) e E_k (ponto mínimo de saturação de ETR à luz) estão expostos na Figura 6. O ETR_m dos indivíduos tratados com 500 e 1000 ppm de REA foi significativamente superior ao dos indivíduos controle (Figura 6A). O parâmetro α não variou significativamente entre os tratamentos (Figura 6B). O E_k , relacionado à capacidade fotossintética máxima, aumentou de forma significativa após tratamento com 1000 ppm de REA (Figura 6C).

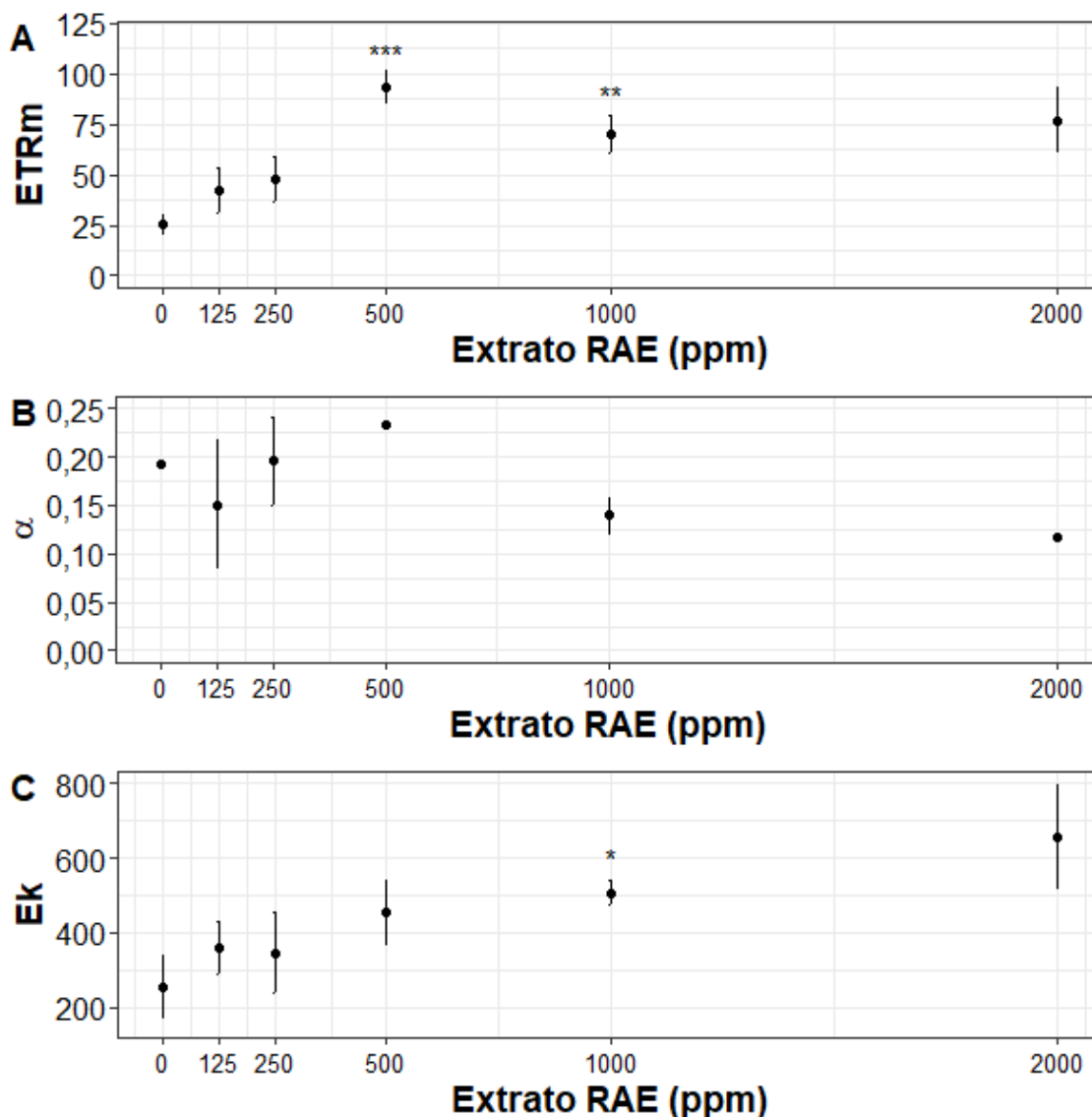


Figura 6. Efeito do tratamento com o extrato acetato de etila de raízes de *Urochloa humidicola* (RAE) sobre parâmetros fotossintéticos de curvas rápidas de resposta à luz de cotilédones de gergelim. (A) ETR_m : taxa máxima de transporte de elétrons. (B) α : aumento inicial da curva, proporcional à eficiência de captura da luz. (C) E_k : parâmetro de saturação da luz. Dados expostos como média \pm erro padrão. (*), (**) e (***) representam diferenças significativas após realização de teste-t ($p < 0,05$; $0,01$; $0,001$, respectivamente).

Discussão

Neste trabalho, buscou-se avaliar o efeito do extrato RAE, não somente sobre a inibição do desenvolvimento inicial, como também sobre distintos parâmetros fisiológicos, incluindo fotossintéticos. O extrato RAE, a 2000 ppm, causou uma inibição marcante no desenvolvimento inicial do gergelim, reduzindo em 82,54% o comprimento total desses indivíduos, enquanto as demais concentrações exerceram efeito inibitório significativamente menor. Esses resultados são importantes para demonstrar o potencial fitotóxico de raízes de *U. humidicola*, dada a carência de informações sobre o efeito

inibitório de raízes de espécies de *Urochloa* no desenvolvimento inicial de outras plantas. Estudos mais recentes indicaram que exsudatos radiculares de *U. decumbens* (Stapf) R.D.Webster inibiram o alongamento radicular e caulinar de diferentes espécies-alvo, reiterando a capacidade de liberar substâncias fitotóxicas (DA SILVA *et al.*, 2017). Outros trabalhos que testaram a fitotoxidez das espécies de *Urochloa* se limitaram a avaliação da germinação de sementes (SENARATHNE *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2012), desconsiderando que o efeito fitotóxico é geralmente mais evidente sobre o desenvolvimento pós-germinativo (FERREIRA & AQUILA, 2000).

O desenvolvimento das raízes, a diferenciação dos tecidos vasculares, o alongamento e a divisão celular dependem de regulação de diferentes fitormônios, dentre estes, as auxinas (ALONI *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2017). A respeito do alongamento celular, as auxinas modulam a expressão das expansinas, que causam modificações na plasticidade da parede celular favorecendo a extensibilidade, bem como regulando a atividade das proteínas H⁺-ATPase da membrana plasmática (MAJDA & ROBERT, 2018). Essas proteínas atuam no efluxo de prótons, causando acidificação da rizosfera. Isso faz com que seja conservado tanto o gradiente eletroquímico, que mantém a eficiência na absorção de nutrientes, quanto o potencial osmótico da célula (ABENAVOLI *et al.*, 2010; ZANDONADI *et al.*, 2016). O efeito do extrato RAE sobre o pH rizosférico dos indivíduos de gergelim foi constatado pela redução na acidificação da rizosfera nos indivíduos tratados com RAE 1000 ppm. O pH mais alcalino compromete o alongamento celular, visto que as expansinas não são ativadas sob essas condições (MAJDA & ROBERT, 2018).

Os resultados sugerem que o extrato RAE alterou o pH rizosférico do gergelim, indicando redução da expressão ou do transporte das auxinas, ou por alterações no potencial de membrana dependente das proteínas H⁺-ATPase. Estudos prévios com extratos das raízes de *U. humidicola* isolaram e identificaram o diterpenoide brachialactol, quatro saponinas esteroídicas inéditas na literatura (humidicina A-D) e duas outras saponinas anteriormente descritas (Capítulo 2). Os diterpenoides podem inibir o alongamento radicular e da divisão celular (DING *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2018), assim como inibir a nitrificação biológica no solo (SUBBARAO *et al.*, 2009). As espécies de *Urochloa* podem produzir e armazenar saponinas esteroídicas tanto na raiz como nas partes aéreas (NEPOMUCENO *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017). As saponinas podem inibir o alongamento radicular, como demonstrado em estudos prévios (PÉREZ *et al.*, 2015; JELASSI *et al.*, 2016; NEPOMUCENO *et al.*, 2017; MACÍAS *et al.*, 2019).

Essas substâncias são conhecidas por sua propriedade surfactante, e interagem com componentes esteróidicos de membranas celulares, alterando a permeabilidade e a estabilidade da membrana (HOAGLAND *et al.*, 1996; EECKHAUT *et al.*, 2015). As saponinas presentes no extrato RAE, ao alterarem a integridade e a polarização da membrana, podem ter afetado o efluxo de prótons para o meio extracelular, e conseqüentemente aumentado o pH da rizosfera dos indivíduos de gergelim.

Diferentes classes de metabólitos especiais podem interferir na capacidade fotossintética das plantas-alvo, sendo o FSII um dos principais sítios de ação dessas substâncias (CHENG & CHENG, 2015). Dois parâmetros que podem atestar a integridade do FSII são o F_v/F_m e a Φ_{FSII} (RALPH & GADEMANN, 2005). Um valor de F_v/F_m abaixo de 0,8 é geralmente um indicativo de que o FSII sofre fotoinibição (LÜTTGE *et al.*, 2015). Essa fotoinibição foi observada em diferentes estudos de fitotoxidez, utilizando tanto extratos quanto substâncias puras (HUSSAIN & REIGOSA, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2018; PUIG *et al.*, 2018). Os resultados aqui obtidos não corroboraram tais relatos, visto que o extrato RAE não teve influência significativa sobre o F_v/F_m , indicando que não houve desativação do FSII das folhas cotiledonares do gergelim por nenhum dos tratamentos. Esses resultados sugerem que os cotilédones, por meio de seus mecanismos de proteção à fotoinibição em condições de estresse (ZHENG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2018), podem ter minimizado os efeitos do extrato RAE diretamente sobre os centros de reação do FSII.

A Φ_{FSII} dá uma melhor dimensão do quanto de energia está sendo destinada à etapa fotoquímica (RALPH & GADEMANN, 2005). Menores valores de Φ_{FSII} podem indicar alteração na taxa do transporte linear de elétrons, com provável reflexo nas alterações das propriedades da membrana (HUSSAIN *et al.*, 2011). A exemplo do F_v/F_m , a Φ_{FSII} também pode ser reduzida por substâncias fitotóxicas. Araújo *et al.* (2018) observaram redução tanto do F_v/F_m como do Φ_{FSII} do pequiheiro (*Cariocar brasiliense* Camb.) após adição ao solo de resíduos de partes aéreas das espécies forrageiras *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster, *Melinis minutiflora* P. Beauv e *Paspalum notatum* Flügge. Diferentes substâncias fitotóxicas como cumarinas, ácido cinâmico e benzoxalin-2(3H)-ona (BOA) causaram decréscimo desse valor em pesquisas com alface (*Lactuca sativa* L.) e *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (SÁNCHEZ-MOREIRAS *et al.*, 2010; HUSSAIN *et al.*, 2011; ARANITI *et al.*, 2017). O extrato RAE, nas suas concentrações mais altas, causou redução da eficiência quântica efetiva do FSII (Φ_{FSII}), ao passo que

suas concentrações mais baixas (125 e 250 ppm) apresentaram tendência à maior Φ_{FSII} que os indivíduos controles. As propriedades surfactantes das saponinas podem afetar a permeabilidade e a estabilidade da membrana (HOAGLAND *et al.*, 1996; EECKHAUT *et al.*, 2015). Portanto, é provável que as substâncias presentes no extrato tivessem maior efeito sobre a cadeia transportadora de elétrons ao longo das membranas dos tilacóides, e não sobre o FSII propriamente dito.

Os parâmetros ETR_m e E_k , obtidos por meio das análises de curva rápida de resposta à luz, apresentaram um aumento, a partir de 500 ppm do extrato RAE, ao passo que α não alterou significativamente entre tratamentos. Estudos avaliando alterações desses parâmetros fotossintéticos em resposta a agentes fitotóxicos são escassos e apresentam uma tendência distinta à observada neste estudo. Xu *et al.* (2017) observaram que o ácido linoleico, nas concentrações de 0,001 a 0,004 ppm, causou a redução dos valores de α e ETR_m na cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju, enquanto concentrações inferiores não causaram qualquer efeito significativo. Outros trabalhos relataram que substâncias fenólicas ácido protocatecuico e a (-)-cumarina, e o triterpenoide ácido ursólico causaram redução do ETR_m em plântulas de pepino (WANG *et al.*, 2013, 2014). Provavelmente, os aumentos de ETR_m e E_k observados aqui sugerem capacidade de fotoaclimatação através de reorganização do aparato fotossintético, em resposta ao estresse causado pelo extrato (CHEN *et al.*, 2016; CRUCES *et al.*, 2017; LACOUR *et al.*, 2019). Outra hipótese para o aumento de tais valores está relacionada com a regulação da abertura estomática nas plantas-alvo. Diferentes substâncias fitotóxicas podem interagir com o ácido abscísico (ABA), o qual participa na regulação da abertura estomática, e impede o fechamento estomático através da regulação do fluxo de íons K^+ (LALORAYA *et al.*, 1986; BI *et al.*, 2017). Embora a maior abertura estomática represente potencial aumento na assimilação do CO_2 , a perda de água via transpiração também aumenta. Neste trabalho, o aumento do ETR_m e do E_k nos cotilédones de gergelim tratados com o extrato RAE pode sugerir que as substâncias presentes no extrato podem afetar a regulação da abertura estomática, aumentando a eficiência fotossintética no curto prazo e aumentando a dessecação a médio e longo prazo.

Os resultados apresentados neste estudo indicam que o extrato acetato de etila de raízes de *U. humidicola* (RAE) apresentou potencial fitotóxico ao inibir o alongamento caulinar e radicular dos indivíduos de gergelim. A visível alteração no pH da rizosfera sugere que o extrato inibe o alongamento celular por acidificação. A eficiência quântica

fotossintética efetiva também foi afetada, como demonstrado na redução da Φ_{PSII} e nas variações de ETRm e E_k . Tais efeitos podem estar relacionados com as propriedades surfactantes das saponinas, substâncias majoritárias do extrato em estudo. Os resultados encontrados trazem novos indicativos de fitotoxidez de substâncias encontradas em *U. humidicola*, bem como seus possíveis modos de ação sobre a planta-alvo.

Referências Bibliográficas

- ABENAVOLI, M.R.; LUPINI, A.; OLIVA, S.; SORGONÀ, A. Allelochemical effects on net nitrate uptake and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize seedlings. *Biologia Plantarum*, v. 54, n. 1, p. 149–153, 2010.
- ALONI, R.; ALONI, E.; LANGHANS, M.; ULLRICH, C.I. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: Regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany*, v. 97, n. 5, p. 883–893, 2006.
- ALVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C.; DE MORAES GONÇALVES, J.L.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.
- ARANITI, F.; SCOGNAMIGLIO, M.; CHAMBERY, A.; RUSSO, R.; ESPOSITO, A.; D'ABROSCA, B.; FIORENTINO, A.; LUPINI, A.; SUNSERI, F.; ABENAVOLI, M.R. Highlighting the effects of coumarin on adult plants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. by an integrated -omic approach. *Journal of Plant Physiology*, v. 213, p. 30–41, 2017.
- ARAÚJO, A. C. F.; MADALÃO, J. C.; JAKELAITIS, A.; COSTA, A. C.; ALMEIDA, G. M. Residues of forage species affect photosynthetic characteristics of the pequiheiro. *Revista Caatinga*, v. 31, n. 1, p. 9–18, 2018.
- BAO, F.; ASSIS, M.A.; ARRUDA, R.; POTT, A. Effects of *Urochloa humidicola* on plant diversity in native grasslands in a neotropical wetland. *Wetlands*, v. 35, n. 5, p. 841–850, 2015.
- BI, B.; TANG, J.; HAN, S.; GUO, J.; MIAO, Y. Sinapic acid or its derivatives interfere with abscisic acid homeostasis during *Arabidopsis thaliana* seed germination. *BMC Plant Biology*, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2017.
- CASTRO, S.A.B.; SÁ, C.E.M.; MOURÃO, F.A.; DUARTE, H.M.; FERNANDES, G.W.; LEMOS-FILHO, J.P. Ecophysiological performance of a threatened shrub under restored and natural conditions in a harsh tropical mountaintop environment.

Acta Botanica Brasilica, v. 30, n. 1, p. 17–26, 2016.

- CHEN, J.; CAO, T.; ZHANG, X.; XI, Y.; NI, L.; JEPPESEN, E. Differential photosynthetic and morphological adaptations to low light affect depth distribution of two submersed macrophytes in lakes. *Scientific Reports*, v. 6, n. April, p. 1–9, 2016.
- CHENG, F.; CHENG, Z. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, November, p. 1–16, 2015.
- CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K. M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 72, p. 1–20, 2013.
- CRUCES, E.; RAUTENBERGER, R.; ROJAS-LILLO, Y.; CUBILLOS, V. M.; ARANCIBIA-MIRANDA, N.; RAMÍREZ-KUSHEL, E.; GÓMEZ, I. Physiological acclimation of *Lessonia spicata* to diurnal changing PAR and UV radiation: differential regulation among down-regulation of photochemistry, ROS scavenging activity and phlorotannins as major photoprotective mechanisms. *Photosynthesis Research*, v. 131, n. 2, p. 145–157, 2017.
- DA SILVA, L.M.I.; DA SILVA, M.J.; ROCHA, J.S.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; STOLF-MOREIRA, R.; OLIVEIRA, H.C. Potential allelopathic effect of *Brachiaria decumbens* root exudates on neotropical tree seedlings. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, v. 29, n. 4, p. 177–186, 2017.
- DAYAN, F.E.; HOWELL, J.; WEIDENHAMER, J.D. Dynamic root exudation of sorgoleone and its in planta mechanism of action. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, n. 7, p. 2107–2117, 2009.
- DE ANDRADE SANTIAGO, J.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M.; APARECIDA DA CRUZ, F.; PALMIERI, M.J.; VIEIRA DE SOUZA, R.; SOARES, L.I.; DE CAMPOS, J.M.S.; ANDRADE-VIEIRA, L.F. Cytogenotoxic effect of essential oil from *Backhousia citriodora* L. (Myrtaceae) on meristematic cells of *Lactuca sativa* L. *South African Journal of Botany*, v. 112, p. 515–520, 2017.
- DING, L.; JING, H.; QIN, B.; QI, L.; LI, J. Regulation of cell division and growth in roots of *Lactuca sativa* L. seedlings by the ent-kaurene diterpenoid ramosin B. *Journal of Chemical Ecology*, v. 36, v. 5, p. 553–563, 2010.
- EECKHAUT, I.; CAULIER, G.; BRASSEUR, L.; FLAMMANG, P.; GERBAUX, P.; PARMENTIER, E. Effects of holothuroid ichthyotoxic saponins on the gills of free-

- living fishes and symbiotic pearlfishes. *Biological Bulletin*, v. 228, n. 3, p. 253–265, 2015.
- EINHELLIG, F.A. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; MOLINILLO, J.M.G.; CUTLER, H.(Ed.). *Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals*. Boca Ratón: CRC Press, 2004. p. 217–238.
- FEITOZA, R.B.B.; LIMA, H.R.P.; OLIVEIRA, E.A.G.; OLIVEIRA, D.R.; MORAES, L.F.D.; OLIVEIRA, A.E.A.; CARVALHO, M.G.; DA CUNHA, M. Structural and ultrastructural variations in roots of *Calopogonium mucunoides* Desv. treated with phenolic compounds from *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga and phenolic commercial standards. *South African Journal of Botany*, v. 116, p. 142–149, 2018.
- FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, Edição Especial, p. 175–204, 2000.
- FERREIRA, L.V.; PAROLIN, P.; MATOS, D.C.L.; CUNHA, D.A.; CHAVES, P.P.; NECKEL, S.O. The effect of exotic grass *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster (Poaceae) in the reduction of species richness and change of floristic composition of natural regeneration in the Floresta Nacional de Carajás, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 88, p. 589–597, 2016.
- FERREIRA, R.R.M.; TAVARES FILHO, J.; FERREIRA, V.M. Effects of pasture system management on physical properties. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, n. 4, p. 913–932, 2010.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 990, n. 1, p. 87–92, 1989.
- GOPALAKRISHNAN, S.; SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; YOSHIHASHI, T.; ITO, O.; MAEDA, I.; ONO, H.; YOSHIDA, M. Nitrification inhibitors from the root tissues of *Brachiaria humidicola*, a tropical grass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 1385–1388, 2007.
- HOAGLAND, R.E.; ZABLOTOWICZ, R.M.; REDDY, K.N. Studies on the phytotoxicity of saponins on weed and crop plants. In: WALLER G.R.; YAMASAKI K. *Saponins Used in Food and Agriculture*. Boston: Springer, 1996. p. 57–73.

- HU, Y.; NA, X.; LI, J.; YANG, L.; YOU, J. Narciclasine , a potential allelochemical , affects subcellular trafficking of auxin transporter proteins and actin cytoskeleton dynamics in *Arabidopsis* roots. *Planta*, v. 242, n. 6, p. 1349–1360, 2015.
- HUSSAIN, M.I.; GONZÁLEZ, L.; CHIAPUSIO, G.; REIGOSA, M.J. Benzoxazolin-2(3H)-one (BOA) induced changes in leaf water relations, photosynthesis and carbon isotope discrimination in *Lactuca sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 49, n. 8, p. 825–834, 2011.
- HUSSAIN, M.I.; REIGOSA, M.J. Allelochemical stress inhibits growth, leaf water relations, PSII photochemistry, non-photochemical fluorescence quenching, and heat energy dissipation in three C3 perennial species. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n. 13, p. 4533–4545, 2011.
- IBGE. Censo Agropecuário. Rio de Janeiro: IBGE, 2006.
- INMET. Rede de Estações Climatológicas. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/index>>.
- JELASSI, A.; AYEB-ZAKHAMA, A.E.; NEJMA, A.B.; CHAARI, A.; HARZALLAH-SKHIRI, F.; JANNET, H.B. Phytochemical composition and allelopathic potential of three Tunisian *Acacia* species. *Industrial Crops and Products*, v. 83, p. 339-345, 2016.
- KATO-NOGUCHI, H.; KOBAYASHI, A.; OHNO, O.; KIMURA, F.; FUJII, Y.; SUENAGA, K. Phytotoxic substances with allelopathic activity may be central to the strong invasive potential of *Brachiaria brizantha*. *Journal of Plant Physiology*, v. 171, n. 7, p. 525–530, 2014.
- LACOUR, T.; MORIN, P. I.; SCIANDRA, T.; DONAHER, N.; CAMPBELL, D. A.; FERLAND, J.; BABIN, M. Decoupling light harvesting, electron transport and carbon fixation during prolonged darkness supports rapid recovery upon re-illumination in the Arctic diatom *Chaetoceros neogracilis*. *Polar Biology*, v. 42, n. 10, p. 1787-1799, 2019.
- LALORAYA, M.M.; NOZZOLILLO, C.; PUROHIT, S.; STEVENSON, L.; VISHWAVIDYALAYA, D.A. Reversal of Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure by *trans*-Cinnamic and *p*-Coumaric Acid. *Plant Physiology*, v. 81, n. 1, p. 253–258, 1986.
- LIU, J.; MOORE, S.; CHEN, C.; LINDSEY, K. Crosstalk complexities between auxin, cytokinin, and ethylene in *Arabidopsis* root development: from experiments to systems modeling, and back again. *Molecular Plant*, v. 10, n. 12, p. 1480–1496,

2017.

- LOBET, G.; PAGÈS, L.; DRAYE, X. A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. *Plant Physiology*, v. 157, n. 1, p. 29–39, 2011.
- LÜTTGE, U.; SCARANO, F.R.; DE MATTOS, E.A.; FRANCO, A. C.; BROETTO, F.; DIAS, A.T.C.; DUARTE, H.M.; UEHLEIN, N.; WENDT, T. Does ecophysiological behaviour explain habitat occupation of sympatric *Clusia* species in a Brazilian Atlantic rainforest? *Trees - Structure and Function*, v. 29, n. 6, p. 1973–1988, 2015.
- MACÍAS, F. A.; MEJÍAS, F.J.R.; MOLINILLO, J.M.G. Recent advances in allelopathy for weed control: from knowledge to applications. *Pest Management Science*, v. 75 n. 9, p. 2413–2436, 2019.
- MAJDA, M.; ROBERT, S. The role of auxin in cell wall expansion. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 4, p. 951, 2018.
- MARTINS, D.; MARTINS, C.C.; COSTA, N.V. Potencial alelopático de soluções de solo cultivado com *Brachiaria brizantha*: efeitos sobre a germinação de gramíneas forrageiras e plantas daninhas de pastagens. *Planta Daninha*, v. 24, n. 1, p. 61–70, 2006.
- NEPOMUCENO, M.; CHINCHILLA, N.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; LACRET, R.; ALVES, P.L.C.A.; MACIAS, F.A. Chemical evidence for the effect of *Urochloa ruziziensis* on glyphosate-resistant soybeans. *Pest Management Science*, v. 73, n. 10, p. 2071–2078, 2017.
- OLIVEIRA, D.R.; NEPOMUCENO, D.D.; CASTRO, R.N.; BRAZ FILHO, R.; CARVALHO, M.G. Special metabolites isolated from *Urochloa humidicola* (Poaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, n. 2, p. 789–797, 2017.
- PÉREZ, A.J.; HUSSAIN, S.M.; PECIO, Ł.; KOWALCZYK, M.; HERLING, V.R.; STOCHMAL, A. Ultrahigh-performance liquid chromatography-high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry based metabolomics reveals key differences between *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha*, two similar pastures with different toxicities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, n. 22, p. 4686–4694, 2016.
- PÉREZ, A.J.; SIMONET, A.M.; PECIO, Ł.; KOWALCZYK, M.; CALLE, J.M.; MACÍAS, F. A.; OLESZEK, W.; STOCHMAL, A. Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Trifolium argutum* Sol. and their phytotoxic evaluation.

- Phytochemistry Letters*, v. 13, p. 165–170, 2015.
- PIRES, V.S.; TAKETA, A.T.C.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Saponins and saponinins from *Brachiaria decumbens* Stapf. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 13, n. 2, p. 135–139, 2002.
- PUIG, C.G.; REIGOSA, M.J.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; PEDROL, N. Unravelling the bioherbicide potential of *Eucalyptus globulus* Labill: Biochemistry and effects of its aqueous extract. *PLoS ONE*, v. 13, n. 2, p. 1–16, 2018.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2019.
- RALPH, P.J.; GADEMANN, R. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic Botany*, v. 82, n. 3, p. 222–237, 2005.
- REIGOSA, M.; GOMES, A.S.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Allelopathic research in Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 27, n. 4, p. 629–646, 2013.
- RIBEIRO, R.C.; CARVALHO, M.G.; LOPES, H.M.; ROSSIELLO, R.O.P.; BARBIERI JUNIOR, E. Allelopathic activity of the hydrolate and water decoction of *Brachiaria humidicola* (Rendle) plant parts on the germination of four tropical leguminous species. *ISRN Agronomy*, v. 2012, p. 1–6, 2012.
- RIBEIRO, R.C.; FEITOZA, R.B.B.; LIMA, H.R.P.; CARVALHO, M.G. Phytotoxic effects of phenolic compounds on *Calopogonium mucunoides* (Fabaceae) roots. *Australian Journal of Botany*, v. 63, n. 8, p. 679–686, 2015.
- SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; REIGOSA, M.J. Reduced Photosynthetic activity is directly correlated with 2-(3H)-benzoxazolinone accumulation in lettuce leaves. *Journal of Chemical Ecology*, v. 36, n. 2, p. 205–209, 2010.
- SANTOS, L.S.; SANTOS, J.C.L.; SOUZA FILHO, A.P.S.; CORRÊA, M.J.C.; VEIGA, T.A.M.; FREITAS, V.C.M.; FERREIRA, I.C.S.; GONÇALVES, N.S.; SILVA, C.E.; GUILHON, G.M.S.P. Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas do Capim-Marandu e suas variações em função do pH. *Planta Daninha*, v. 26, n. 3, p. 531–538, 2008.
- SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.
- SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: SCHULZE, E.-D.; CALDWELL, M. M. (Ed.). *Ecophysiology of Photosynthesis*.

- Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1995. p. 49–70.
- SENARATHNE, S.H.S.; DISSANAYAKA, D.N.M.; VIDHANA ARACHCHI, L.P. Allelopathic potential of *Brachiaria brizantha* and *B. milliformis* on seed germination of selected bioassay species. *Pakistan Journal of Weed Science Research*, v. 16, n. 2, p. 207–216, 2010.
- SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; PEREIRA, A.A.G.; BAYMA, J.C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. *Planta Daninha*, v. 23, n. 1, p. 25–32, 2005.
- SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M.P.; ONO, H.; MORETA, D.E.; SALCEDO, A.F.; YOSHIHASHI, A.T.; ISHIKAWA, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I.M.; LASCANO, C.E.; BERRY, W.L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 41, p. 17302–17307, 2009.
- SUDATTI, D.B.; FUJII, M.T.; RODRIGUES, S.V.; TURRA, A.; DUARTE, H.M.; SOARES, A.R.; PEREIRA, R.C. Diel variation of sesquiterpene elatol production: A chemical defense mechanism of the red seaweed *Laurencia dendroidea*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 64, p. 131–135, 2016.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5. ed., Artmed, 2013. 918p.
- THOMAS, P.A.; SCHÜLER, J.; BOAVISTA, L.R.; TORCHELSEN, F.P.; OVERBECK, G.E.; MÜLLER, S.C. Controlling the invader *Urochloa decumbens*: Subsidies for ecological restoration in subtropical Campos grassland. *Applied Vegetation Science*, v. 22, n. 1, p. 96–104, 2019.
- TOMASZEWSKIL, M.; THIMANN, K. V. Interactions of phenolic acids , metallic ions and chelating agents on auxin-induced growth. *Plant Physiology*, v. 41, n. 9, p. 1443–1454, 1966.
- TUKEY, J.W. Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*, v. 5, n. 2, p. 99-114, 1949.
- WANG, C.M.; CHEN, H.T.; LI, T.C.; WENG, J.H.; JHAN, Y.L.; LIN, S.X.; CHOU, C.H. The role of pentacyclic triterpenoids in the allelopathic effects of *Alstonia scholaris*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 40, n. 1, p. 90–98, 2014.
- WANG, C.M.; LI, T.C.; JHAN, Y.L.; WENG, J.H.; CHOU, C.H. The Impact of microbial

- biotransformation of catechin in enhancing the allelopathic effects of *Rhododendron formosanum*. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, p. 1–14, 2013.
- WANG, Y.; JIE, W.; PENG, X.; HUA, X.; YAN, X.; ZHOU, Z.; LIN, J. Physiological adaptive strategies of oil seed crop *Ricinus communis* early seedlings (cotyledon vs. true leaf) under salt and alkali stresses: from the growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, p. 1939, 2018.
- WILCOXON, F. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bulletin*, v. 1, n. 6, p. 80-83. 1945.
- XU, S.; YANG, S.Q.; YANG, Y.J.; XU, J.Z.; SHI, J.Q.; WU, Z.X. Influence of linoleic acid on growth, oxidative stress and photosynthesis of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, v. 51, n. 2, p. 223–236, 2017.
- ZANDONADI, D.B.; SANTOS, M.P.; CAIXETA, L.S.; MARINHO, E.B.; PERES, L.E.P.; FAÇANHA, A.R. Plant proton pumps as markers of biostimulant action. *Scientia Agricola*, v. 73, n. 1, p. 24–28, 2016.
- ZANDONADI, D.B.; SANTOS, M.P.; DOBBSS, L.B.; OLIVARES, F.L.; CANELLAS, L.P.; BINZEL, M L.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L.; FAÇANHA, A.R. Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta*, v. 231, n. 5, p. 1025–1036, 2010.
- ZHAO, M.; CHENG, J.; GUO, B.; DUAN, J.; CHE, C. Momilactone and related diterpenoids as potential agricultural chemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, n. 30, p. 7859–7872, 2018.
- ZHENG, W.; WANG, P.; ZHANG, H.; ZHOU, D. Photosynthetic characteristics of the cotyledon and first true leaf of castor (*Ricinus communis* L.). *Australian Journal of Crop Science*, v. 5, n. 6, p. 702-708, 2011.
- ZHOU, Y.H.; YU, J.Q. Allelochemicals and photosynthesis. In: REIGOSA, M.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.) *Allelopathy*. Dordrecht: Springer, 2006. p. 127–139.

4. DISCUSSÃO GERAL

Neste estudo se propôs avaliar os mecanismos de interações planta-planta. A espécie exótica *Urochloa humidicola* foi adotada neste trabalho devido ao seu potencial invasor no Brasil, e aos seus potenciais impactos nos sistemas agrários e na biodiversidade dos ecossistemas nativos (RIBEIRO *et al.*, 2012; DE FARIA *et al.*, 2015). As avaliações que buscaram explicar as interações de *U. humidicola* com espécies nativas da Mata Atlântica seguiram duas hipóteses: a *Homeland Security* (HS) e a *Novel Weapon Hypothesis* (NWH). A hipótese da *Homeland Security* sugere que as espécies nativas desenvolvem algum mecanismo de resistência à invasão (CUMMINGS *et al.*, 2012). Neste trabalho, a HS foi testada com os indivíduos de *U. humidicola* previamente germinados em substratos onde anteriormente foram crescidos indivíduos das espécies nativas da Mata Atlântica, *Anadenanthera colubrina* e *Guarea guidonia*. Os componentes do substrato das duas nativas não tiveram efeito inibitório no desenvolvimento inicial dos indivíduos de *U. humidicola*. Os poucos estudos que avaliaram a HS foram conduzidos na Europa. Christina *et al.* (2015) observaram efeito alelopático de *Sambucus ebulus* L., nativa no continente europeu, sobre *Fallopia x bohémica* (Chrtek & Chrtková) J.P. Bailey, invasora no ambiente de *S. ebulus*, corroborando a HS. Por outro lado, Thiébaud *et al.* (2019) reportaram ausência de efeito alelopático de exsudatos de *Mentha aquatica* L. sobre a invasora *Ludwigia hexapétala* (Hook. & Arn.) Zardini *et al.* Esses autores concluíram que *M. aquatica* não apresentou “resistência biótica” à invasora. Da mesma forma, os resultados obtidos neste estudo indicaram que *A. colubrina* e *G. guidonia* não seriam eficazes no controle populacional de *U. humidicola*.

A segunda avaliação buscou testar a *Novel Weapon Hypothesis*, na qual as espécies exóticas interfeririam no estabelecimento das espécies nativas, por mediação de aleloquímicos, promovendo sua expansão no novo ambiente (CALLAWAY & RIDENOUR, 2004). Os componentes do substrato obtidos de uma área cultivada com *U. humidicola* por cerca de 30 anos inibiram significativamente o desenvolvimento inicial do gergelim. Esse mesmo substrato não interferiu no desenvolvimento de *A. colubrina*, indicando que essa espécie pode apresentar alguma tolerância a esses componentes. Algumas espécies-alvo poderiam ser menos susceptíveis ao efeito do substrato que outras, ao detoxificar ou compartimentalizar, e conseqüentemente diminuir o efeito alelopático (SHAH *et al.*, 2016). Esses resultados contrastantes sugerem estudos com um espectro maior de espécies-alvo, incluindo outras espécies nativas, para confirmar se a atividade inibitória de *U. humidicola* atuaria como mecanismo facilitador à invasão dos

ecossistemas nativos.

Os resultados anteriores incentivaram o estudo da fitotoxidez dos extratos das raízes de *U. humidicola* sobre um amplo espectro de espécies-alvo. O extrato acetato de etila (RAE) inibiu a germinação e o desenvolvimento inicial de diferentes espécies-alvo. As espécies mais sensíveis foram as espécies padrões, a cebola e o tomate, as plantas daninhas, *Echinochloa crus-galli*, *Megathyrus maximus* e *Amaranthus viridis*, e a nativa arbórea *A. colubrina*. O efeito inibitório desse extrato sugeriu a presença de substâncias fitotóxicas nas raízes de *U. humidicola*, que poderiam ser liberadas por exsudação radicular e decomposição da planta (KOCAÇAHÇKAN *et al.*, 2009; SUBBARAO *et al.*, 2009). No solo, essas micromoléculas podem apresentar atividade inibitória maior ou menor, dependendo da interação das mesmas com as partículas do solo ou com a biota microbiana (KOBAYASHI, 2004; JILANI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2017). Possivelmente, as substâncias fitotóxicas presentes no extrato tiveram atividade ou disponibilidade reduzidas quando expostas ao substrato e suas variáveis bióticas e abióticas. Dessa forma, abordagens futuras deverão observar o mecanismo de liberação dos metabólitos especiais de *U. humidicola*, bem como a disponibilidade dos mesmos no solo ao longo do tempo.

O efeito fitotóxico do extrato RAE levou ao isolamento biodirigido e à identificação de sete substâncias majoritárias a partir de uma das suas frações, incluindo um diterpenoide e seis saponinas esteroídicas. O brachialactol, descrito pela primeira vez nesse estudo, é um diterpenoide de estrutura química semelhante à da brachialactona, que havia sido previamente identificada nos exsudatos de *U. humidicola*. A brachialactona foi descrita na literatura como inibidora da nitrificação biológica; ou seja, reduzindo a conversão de NH_4^+ a NO_3^- (SUBBARAO *et al.*, 2009). O acúmulo de NH_4^+ representa uma vantagem adicional para *U. humidicola*, visto que essa espécie apresenta maior afinidade por esse íon (NAKAMURA *et al.*, 1998; SULLIVAN *et al.*, 2017).

Dentre as seis saponinas esteroídicas identificadas e isoladas a partir da fração C do extrato RAE, foram elucidadas de forma inédita as humidicinas A-D. Outras saponinas haviam sido detectadas anteriormente, em raízes de *U. humidicola* (OLIVEIRA *et al.*, 2017), e nas partes aéreas de outras espécies do gênero *Urochloa* (PIRES *et al.*, 2002; PÉREZ *et al.*, 2016; NEPOMUCENO *et al.*, 2017). Essa classe de metabólitos é responsável pelo fenômeno da fotossensibilização nos bovinos e nos caprinos, culminando em lesões cutâneas nesses animais (CHUNG *et al.*, 2018). Estudos prévios demonstraram o potencial fitotóxico das saponinas (OLESZEK, 1993; HOAGLAND *et*

al., 1996; PÉREZ *et al.*, 2016; NEPOMUCENO *et al.*, 2017), e os resultados obtidos nos bioensaios anteriores sugerem que essa classe de substâncias poderia ser responsável pela interferência no desenvolvimento das diferentes espécies-alvo.

A identificação das substâncias majoritárias a partir de uma fração do extrato RAE motivou a realização de análises anatômicas e ultraestruturais, com o objetivo de avaliar as alterações causadas pelas substâncias presentes no extrato. As raízes de *A. colubrina*, após tratamento com o extrato RAE, apresentaram alterações anatômicas, como diferenciação precoce de fibras, e formação de estrutura secundária de raiz em regiões mais próximas do ápice radicular. Essas modificações podem ter sido consequências da inibição do crescimento longitudinal das raízes (CHON *et al.*, 2002; FEITOZA *et al.*, 2018). Análises ultraestruturais nas células de raiz de *A. colubrina* apontaram degradação das membranas celulares e da cromatina nuclear. Um dos fatores que pode ter levado à destruição das membranas seria a atuação das saponinas, que são conhecidas por sua propriedade surfactante, e por sua fácil interação com as membranas celulares através de esteróis de membrana, comprometendo a integridade da membrana e afetando a permeabilidade da mesma (HOAGLAND *et al.*, 1996; EECKHAUT *et al.*, 2015). Em estágios tardios de exposição às saponinas, a célula pode entrar em processo de morte celular programada (HOAGLAND *et al.*, 1996). Um dos indicativos desse processo é a degradação da cromatina nuclear, o que foi observado nas células da espécie-alvo do presente estudo.

As alterações anatômicas e ultraestruturais observadas neste estudo sugeriram ação das saponinas presentes no extrato RAE, levantando interesse em realizar análises fisiológicas nas raízes e nos cotilédones do gergelim, com o propósito de sugerir um possível modo de ação dessas substâncias. Nos indivíduos controle, a acidificação do pH da rizosfera é realizada por atividade das proteínas H⁺-ATPase de membrana plasmática, e o baixo pH é necessário para a atividade das expansinas no alongamento celular (MAJDA & ROBERT, 2018). Os indivíduos de gergelim tratados como extrato RAE, após transportados para meio ágar com indicador bromocresol púrpura, apresentaram aumento do pH rizosférico. O efeito observado pode ter sido causado pela perda da integridade da membrana causada pelas substâncias do extrato, o que levou ao desbalanço do gradiente de íons H⁺, culminou em alterações no pH que inibiram a atividade das expansinas, e refletiu no menor crescimento das raízes do gergelim.

A avaliação dos parâmetros da fluorescência da clorofila, em folhas cotiledonares de gergelim, após tratamento com o extrato RAE, poderia indicar interferência das

substâncias presentes no extrato sobre a eficiência fotossintética da espécie-alvo (CHENG & CHENG, 2015). O tratamento com RAE não afetou a eficiência quântica potencial do PSII (F_v/F_m), sugerindo que não houve efeito direto do extrato sobre o PSII. O efeito do RAE foi mais evidente sobre a eficiência quântica efetiva (Φ_{PSII}) que, ao estimar a proporção de energia destinada à etapa fotoquímica da fotossíntese, pode indicar alterações na cadeia transportadora de elétrons nas membranas dos tilacóides (RALPH & GADEMANN, 2005; HUSSAIN *et al.*, 2011). Esses resultados indicaram possível ação de saponinas na alteração das propriedades das membranas celulares, afetando o transporte linear de elétrons, interferindo na eficiência fotossintética (HUSSAIN & REIGOSA, 2011). As plântulas crescidas com o extrato RAE apresentaram aumento dos parâmetros da curva rápida de resposta à luz, ETR_m e E_k , um efeito reverso ao observado na literatura após bioensaios de fitotoxidez (WANG *et al.*, 2013, 2014; XU *et al.*, 2017). Esses resultados podem sugerir: (i) aclimatação do aparato fotossintético (LACOUR *et al.*, 2019); ou (ii) deficiência na regulação da abertura estomática (LALORAYA *et al.*, 1986; BI *et al.*, 2017), que significaria um aumento na eficiência fotossintética, a curto prazo, e perda excessiva de água por transpiração, a médio e a longo prazo.

Estudos futuros que busquem elucidar o mecanismo de ação de *U. humidicola* sobre demais espécies nativas merecem continuidade, com o intuito de se buscarem novas classes de metabólitos especiais com efeito fitotóxico, bem como avaliar a dinâmica dessas substâncias no solo, e a resposta da planta-alvo a essas substâncias fitotóxicas.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- Neste trabalho, os componentes do substrato de áreas com monodominância de *Urochloa humidicola* inibiram o desenvolvimento inicial do gergelim, indicando possível efeito fitotóxico desse substrato e adequação ao modelo da *Novel Weapon Hypothesis*.
- O desenvolvimento inicial de *U. humidicola* não foi afetado pelos componentes do solo das espécies arbóreas nativas, *A. colubrina* e *G. guidonia*, descartando o possível uso dessas espécies no manejo de áreas ocupadas pela espécie exótica.
- Dentre os extratos obtidos das raízes de *U. humidicola*, o extrato acetato de etila (RAE) apresentou maior efeito inibitório sobre diferentes espécies-alvo, incluindo *A. colubrina*, e espécies de plantas daninhas.
- O isolamento biodirigido, a partir do extrato RAE, possibilitou o isolamento e a identificação de sete substâncias majoritárias. O diterpenoide braquialactol e as saponinas esteroídicas humidicinas A-D são registros inéditos na literatura.
- O efeito do extrato RAE sobre a acidificação da rizosfera e a eficiência fotoquímica do fotossistema II sugerem possíveis mecanismos de ação das substâncias majoritárias.
- Este estudo ressaltou a importância de um manejo adequado das áreas cultivadas com *U. humidicola*. A produção e liberação de substâncias fitotóxicas de diferentes classes químicas, como os diterpenoides e as saponinas esteroídicas, associada à deficiência de nutrientes e de água no solo, afetaria a produtividade dessas pastagens, dificultando a recuperação das áreas invadidas por essa espécie.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar o efeito inibitório de *Urochloa humidicola* sobre um espectro maior de espécies-alvo nativas, com o objetivo de prosseguir com testes da *Novel Weapon Hypothesis*.
- Prosseguir prospecção de espécies nativas com potencial alelopático sobre espécies exóticas de *Urochloa*, para subsidiar estudos e projetos de restauração ambiental.
- Prosseguir estudos com *U. humidicola* para prospecção de novas substâncias fitotóxicas, e para o uso potencial desses metabólitos como herbicidas naturais, atuando no controle de outras espécies de plantas daninhas, dentro do conjunto de propostas que caracterizam a agricultura sustentável.
- Elucidar o mecanismo de ação das saponinas esteroídicas encontradas em *U. humidicola* sobre as espécies-alvo, bem como avaliar a dinâmica dessas substâncias no solo desde a liberação das mesmas ao ambiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, T.; NADEEM, M.A.; TANVEER, A.; ALI, H.H.; FAROOQ, N. Role of allelopathic crop mulches and reduced doses of tank-mixed herbicides in managing herbicide-resistant *Phalaris minor* in wheat. *Crop Protection*, v. 110, p. 245–250, 2018.
- ABGRALL, C.; FOREY, E.; MIGNOT, L.; CHAUVAT, M. Invasion by *Fallopia japonica* alters soil food webs through secondary metabolites. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 127, p. 100–109, 2018.
- AJALA-LUCCAS, D.; RIBEIRO-OLIVEIRA, J.P.; DUARTE SILVEIRA, L.E.; DA SILVA, E.A.A. An integrative insight on dormancy alleviation in diaspores of *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga, a tropical grass with great economic and ecological impact. *Plant Biology*, v. 20, n. 2, p. 252–262, 2018.
- ALONI, R.; ALONI, E.; LANGHANS, M.; ULLRICH, C.I. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: Regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany*, v. 97, n. 5, p. 883–893, 2006.
- AMBIEL, A.C.; GUABERTO, L.M.; VANDERLEI, T.M.; NETO, N.B.M. Agrupamento de acessos e cultivares de três espécies de *Brachiaria* por RAPD. *Acta Scientiarum - Agronomy*, v. 30, n. 4, p. 457–464, 2008.
- ARANITI, F.; BRUNO, L.; SUNSERI, F.; PACENZA, M.; FORGIONE, I.; BITONTI, M.B.; ABENAVOLI, M.R. The allelochemical farnesene affects *Arabidopsis thaliana* root meristem altering auxin distribution. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 121, n. 113, p. 14–20, 2017.
- ARANITI, F.; COSTAS-GIL, A.; CABEIRAS-FREIJANES, L.; LUPINI, A.; SUNSERI, F.; REIGOSA, M.J.; ABENAVOLI, M.R.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M. Rosmarinic acid induces programmed cell death in *Arabidopsis* seedlings through reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction. *Plos One*, v. 13, n. 12, e0208802, 2018.
- ARAÚJO, A.C.F.; MADALÃO, J.C.; JAKELAITIS, A.; COSTA, A.C.; ALMEIDA, G. M. Residues of forage species affect photosynthetic characteristics of the pequiheiro. *Revista Caatinga*, v. 31, n. 1, p. 9–18, 2018.
- ASLANI, F.; JURAIMI, A.S.; AHMAD-HAMDANI, M.S.; SADAT, F.; HASHEMI, G.; ALAM, M.A.; OMAR, D.; UDDIN, K.; HAKIM, M.A. Variation in the phytotoxic activity of *Tinospora tuberculata* extracts as influenced by solvent type and

- chemical profile. *Current Science*, v. 110, n. 2, p. 228–233, 2016.
- BAO, F.; ASSIS, M.A.; ARRUDA, R.; POTT, A. Effects of *Urochloa humidicola* on plant diversity in native grasslands in a neotropical wetland. *Wetlands*, v. 35, n. 5, p. 841–850, 2015.
- BARBOSA, E.G.; PIVELLO, V.R.; MEIRELLES, S.T. Allelopathic evidence in *Brachiaria decumbens* and its potential to invade the Brazilian cerrados. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 51, n. 4, p. 825–831, 2008.
- BARONA, E.; RAMANKUTTY, N.; HYMAN, G.; COOMES, O. T. The role of pasture and soybean in deforestation of the Brazilian Amazon. *Environmental Research Letters*, v. 5, n. 2, 024002, 2010.
- BÄSSLER, F.A. Der Einfluss von Duftstoffen auf die keimung von *Lathyrus odoratus*. *Madaus Jahresbericht*, v. 2, p. 133–137, 1938.
- BAZIRAMAKENGA, R.; LEROUX, G.D.; SIMARD, R.R.; NADEAU, P. Allelopathic effects of phenolic acids on nucleic acid and protein levels in soybean seedlings. *Canadian Journal of Botany*, v. 75, n. 3, p. 445–450, 1997.
- BERNARDI, A.C.C.; OLIVEIRA, P.P.A.; PRIMAVESI, O. Soil fertility of tropical intensively managed forage system for grazing cattle in Brazil. In: WHALEN, J. (Ed.). *Soil Fertility Improvement and Integrated Nutrient Management - A Global Perspective*. Rijeka: InTech, 2012. p. 37–56.
- BESSEAU, S.; HOFFMANN, L.; GEOFFROY, P.; LAPIERRE, C.; POLLET, B.; LEGRAND, M. Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *Plant Cell*, v. 19, n. 1, p. 148–162, 2007.
- BI, B.; TANG, J.; HAN, S.; GUO, J.; MIAO, Y. Sinapic acid or its derivatives interfere with abscisic acid homeostasis during *Arabidopsis thaliana* seed germination. *BMC Plant Biology*, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2017.
- BIELACH, A.; DUCLERCQ, J.; MARHAVY, P.; BENKOVÁ, E. Genetic approach towards the identification of auxin-cytokinin crosstalk components involved in root development. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 367, n. 1595, p. 1469–1478, 2012.
- BLUM, U.; GERIC, G.M. Relationships between phenolic acid concentrations, transpiration, water utilization, leaf area expansion, and uptake of phenolic acids: nutrient culture studies. *Journal of Chemical Ecology*, v. 31, n. 8, p. 1907–1932, 2005.

- BRASIL, F.C. *Estudo de características morfológicas radiculares de uma pastagem de Brachiaria humidicola com auxílio de análise digital de imagens*. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2001. 136 f.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.
- BURGOS, N.R.; TALBERT, R.E.; KIM, K.S.; KUK, Y.I. Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*). *Journal of Chemical Ecology*, v. 30, n. 3, p. 671–689, 2004.
- CAI, X.; GU, M. Bioherbicides in Organic Horticulture. *Horticulturae*, v. 2, n. 2, p. 3, 2016.
- CALLAWAY, R.M.; RIDENOUR, W.M. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Frontiers in Ecology and the Environment*, v. 2, n. 8, p. 436–443, 2004.
- CARSON, C.F.; HAMMER, K.A. Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In: THORMAR, H. (Ed.). *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. Chichester: Wiley, 2011. p. 203–238.
- CARVALHO, S.C.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; ALVARENGA, E.M.; REGAZZI, A.J. Efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu do estabelecimento de plantas de *Stylosanthes guianensis* var. vulgaris e cv. bandeirantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 22, n. 6, p. 930–937, 1993.
- CHENG, F.; CHENG, Z. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 1–16, 2015.
- CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K.M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 72, p. 1–20, 2013.
- CHIAPPETTA, A.; BRUNO, L.; SALIMONTI, A.; MUTO, A.; JONES, J.; ROGERS, H.J.; FRANCIS, D.; BITONTI, M.B. Differential spatial expression of A- and B-type CDKs, and distribution of auxins and cytokinins in the open transverse root apical meristem of *Cucurbita maxima*. *Annals of Botany*, v. 107, n. 7, p. 1223–1234, 2011.
- CHITINDINGU, K.; NDHLALA, A.R.; CHAPANO, C.; BENHURA, M.A.; MUCHUWETI, M. Phenolic compound content, profiles and antioxidant activities

- of *Amaranthus hybridus* (pigweed), *Brachiaria brizantha* (upright brachiaria) and *Panicum maximum* (Guinea grass). *Journal of Food Biochemistry*, v. 31, n. 2, p. 206–216, 2007.
- CHON, S.U.; CHOI, S.K.; JUNG, S.; JANG, H.G.; PYO, B.S.; KIM, S.M. Effects of alfalfa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfalfa and barnyard grass. *Crop Protection*, v. 21, n. 10, p. 1077–1082, 2002.
- CHOU, C.H. Introduction to allelopathy. In: REIGOSA, M.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Ed.). *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*. Dordrecht: Springer, 2006. p. 1–10.
- CHRISTINA, M.; ROUIFIED, S.; PUIJALON, S.; VALLIER, F.; MEIFFREN, G.; BELLVERT, F.; PIOLA, F. Allelopathic effect of a native species on a major plant invader in Europe. *The Science of Nature*, v. 102, n. 3–4, p. 12, 2015.
- CHUNG, E.L.T.; PREDITH, M.; NOBILLY, F.; SAMSUDIN, A.A.; JESSE, F.F.A.; LOH, T.C. Can treatment of *Brachiaria decumbens* (signal grass) improve its utilisation in the diet in small ruminants?—a review. *Tropical Animal Health and Production*, v. 50, n. 8, p. 1727–1732, 2018.
- CIPRIANI, F.A.; KAPLAN, M.A.C.; ISAIAS, R.M.S.; SOARES, G.L.G. Avaliação da fitotoxidez de *Tecoma stans* (L.) Kunth. *Floresta e Ambiente*, v. 21, n. 1, p. 1–7, 2014.
- COSTA, F.; PEREYRA, R.O.; PACIOMIK, S.; RODRIGUES DE ABREU, J.B. Distribuição vertical de características morfológicas do sistema radicular de *Brachiaria humidicola*. *Pasturas Tropicais*, v. 24, n. 3, p. 14–20, 2002.
- CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M.L.C.; GONTIJO NETO, M.M.; SILVA, R.B. *Danos da cigarrinha-das-pastagens, Deois flavopicta Stal (Homoptera: Cercopidae) em milho consorciado com braquiárias*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 10p.
- CRUZ-ORTEGA, R.; ANAYA, A.L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B.E.; LAGUNA-HERNÁNDEZ, G. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 24, n. 12, p. 2039–2057, 1998.
- CUMMINGS, J.A.; PARKER, I.M.; GILBERT, G.S. Allelopathy: a tool for weed management in forest restoration. *Plant Ecology*, v. 213, n. 12, p. 1975–1989, 2012.
- DA SILVA, L.M.I.; DA SILVA, M.J.; ROCHA, J.S.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.;

- STOLF-MOREIRA, R.; OLIVEIRA, H.C. Potential allelopathic effect of *Brachiaria decumbens* root exudates on neotropical tree seedlings. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, v. 29, n. 4, p. 177–186, 2017.
- DAVIS, M.A.; GRIME, J.P.; THOMPSON, K. Fluctuating resources in plant communities: a general theory of invasibility. *Journal of Ecology*, n. 88, p. 528–534, 2000.
- DE ANDRADE SANTIAGO, J.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M.; APARECIDA DA CRUZ, F.; PALMIERI, M.J.; VIEIRA DE SOUZA, R.; SOARES, L.I.; DE CAMPOS, J.M.S.; ANDRADE-VIEIRA, L.F. Cytogenotoxic effect of essential oil from *Backhousia citriodora* L. (Myrtaceae) on meristematic cells of *Lactuca sativa* L. *South African Journal of Botany*, v. 112, p. 515–520, 2017.
- DE FARIA, A.P.; FERNANDES, G.W.; FRANÇA, M.G.C. Physiological approaches to determine the impact of climate changes on invasive African grasses in the savanna ecoregion of Brazil. *Environmental Earth Sciences*, v. 74, n. 4, p. 3077–3088, 2015.
- DELLO IOIO, R.; NAKAMURA, K.; MOUBAYIDIN, L.; PERILLI, S.; TANIGUCHI, M.; MORITA, M.T.; AOYAMA, T.; COSTANTINO, P.; SABATINI, S. A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, v. 322, n. 5906, p. 1380–1384, 2008.
- DEMNICIS, B.B.; VIEIRA, H.D.; SILVA, R.F.; ABREU, J.B.R.; ARAÚJO, S.A.C.; JARDIM, J.G. Adubação nitrogenada, potássica e fosfatada na produção e germinação de sementes de capim quicuío-da-amazônia. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 32, n. 2, p. 59–65, 2010.
- DING, H.; CHENG, Z.; LIU, M.; HAYAT, S.; FENG, H. Garlic exerts allelopathic effects on pepper physiology in a hydroponic co-culture system. *Biology open*, v. 5, n. 5, p. 631–637, 2016.
- ECKHAUT, I.; CAULIER, G.; BRASSEUR, L.; FLAMMANG, P.; GERBAUX, P.; PARMENTIER, E. Effects of holothuroid ichthyotoxic saponins on the gills of free-living fishes and symbiotic pearlfishes. *Biological Bulletin*, v. 228, n. 3, p. 253–265, 2015.
- EINHELLIG, F.A. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: MACÍAS, F.A. .; GALINDO, J.C.G. .; MOLINILLO, J.M.G. .; CUTLER, H. (Ed.). *Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals*. Boca Ratón: CRC Press, 2004. p. 217–238.
- FAIZAL, A.; GEELEN, D. Saponins and their role in biological processes in plants.

- Phytochemistry Reviews*, v. 12, n. 4, p. 877–893, 2013.
- FAROOQ, M.; BAJWA, A.A.; CHEEMA, S.A.; CHEEMA, Z.A. Application of allelopathy in crop production. *International Journal of Agriculture and Biology*, v. 15, n. 6, p. 1367–1378, 2013.
- FEITOZA, R.B.B.; LIMA, H.R.P.; OLIVEIRA, E.A.G.; OLIVEIRA, D.R.; MORAES, L.F.D.; OLIVEIRA, A.E.A.; CARVALHO, M.G.; DA CUNHA, M. Structural and ultrastructural variations in roots of *Calopogonium mucunoides* Desv. treated with phenolic compounds from *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga and phenolic commercial standards. *South African Journal of Botany*, v. 116, p. 142–149, 2018.
- FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, Edição Especial, p. 175–204, 2000.
- FERREIRA, L.V.; PAROLIN, P.; MATOS, D.C.L.; CUNHA, D.A.; CHAVES, P.P.; NECKEL, S.O. The effect of exotic grass *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster (Poaceae) in the reduction of species richness and change of floristic composition of natural regeneration in the Floresta Nacional de Carajás, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 88, p. 589–597, 2016.
- FERREIRA, R.R.M.; TAVARES FILHO, J.; FERREIRA, V.M. Effects of pasture system management on physical properties. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, n. 4, p. 913–932, 2010.
- FU, Y.H.; QUAN, W.X.; LI, C.C.; QIAN, C.Y.; TANG, F.H.; CHEN, X.J. Allelopathic effects of phenolic acids on seedling growth and photosynthesis in *Rhododendron delavayi* Franch. *Photosynthetica*, v. 57, n. 2, p. 377–387, 2019.
- GALINDO, J.L.G.; GARCÍA, B.F.; TORRES, A.; GALINDO, J.C.G.; ROMAGNI, J.G.; MACÍAS, F.A. The joint action in the bioactivity studies of Antarctic lichen *Umbilicaria antarctica*: Synergic-biodirected isolation in a preliminary holistic ecological study. *Phytochemistry Letters*, v. 20, p. 433–442, 2017.
- GARCEZ, T.B. *Aspectos metabólicos, nutricionais e produtivos de cultivares de Brachiaria e Panicum visando eficiência no uso do nitrogênio*. Tese (Doutorado em Ciências). Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2013. 103 f.
- GARCÍA, B.F.; TORRES, A.; MACÍAS, F.A. Synergy and other interactions between polymethoxyflavones from *Citrus* byproducts. *Molecules*, v. 20, n. 11, p. 20079–20106, 2015.

- GARCÍA-SÁNCHEZ, M.; GARRIDO, I.; JESÚS, I.; JOAQUÍN, P.; ESPINOSA, F.; GARCÍA-ROMERA, I.; ARANDA, E. Chemosphere Defence response of tomato seedlings to oxidative stress induced by phenolic compounds from dry olive mill residue. *Chemosphere*, v. 89, n. 6, p. 708–716, 2012.
- GOPALAKRISHNAN, S.; SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; YOSHIHASHI, T.; ITO, O.; MAEDA, I.; ONO, H.; YOSHIDA, M. Nitrification inhibitors from the root tissues of *Brachiaria humidicola*, a tropical grass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 1385–1388, 2007.
- GRAÑA, E.; COSTAS-GIL, A.; LONGUEIRA, S.; CELEIRO, M.; TEJEIRA, M.; REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M. Auxin-like effects of the natural coumarin scopoletin on *Arabidopsis* cell structure and morphology. *Journal of Plant Physiology*, v. 218, p. 45–55, 2017.
- GRAÑA, E.; SOTELO, T.; DÍAZ-TIELAS, C.; ARANITI, F.; KRASUSKA, U.; BOGATEK, R.; REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M. Citral induces auxin and ethylene-mediated malformations and arrests cell division in *Arabidopsis thaliana* roots. *Journal of Chemical Ecology*, v. 39, n. 2, p. 271–282, 2013.
- GRUNTMAN, M.; ZIEGER, S.; TIELBÖRGER, K. Invasive success and the evolution of enhanced weaponry. *Oikos*, v. 125, n. 1, p. 59–65, 2016.
- GULZAR, A.; SIDDIQUI, M.B.; BI, S. Phenolic acid allelochemicals induced morphological, ultrastructural, and cytological modification on *Cassia sophera* L. and *Allium cepa* L. *Protoplasma*, v. 253, n. 5, p. 1211–1221, 2016.
- HABERMANN, E.; PONTES, F.C.; PEREIRA, V.C.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S.C.J. Phytotoxic potential of young leaves from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae). *Brazilian Journal of Biology*, v. 76, n. 2, p. 531–538, 2016.
- HAGAN, D.L.; JOSE, S.; LIN, C.H. Allelopathic exudates of cogongrass (*Imperata cylindrica*): implications for the performance of native pine savanna plant species in the Southeastern US. *Journal of Chemical Ecology*, v. 39, n. 2, p. 312–322, 2013.
- HALE, A.N.; LAPOINTE, L.; KALISZ, S. Invader disruption of belowground plant mutualisms reduces carbon acquisition and alters allocation patterns in a native forest herb. *The New Phytologist*, v. 209, n. 2, p. 542–9, 2016.
- HARBORNE, J.B.. Classes and functions of secondary products from plants. In: WALTON, N.J.; BROWN, D.E. (Eds), *Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products*. London: Imperial College, 1999, p.1-25.
- HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant

- secondary metabolism. *Phytochemistry*, v. 68, n. 22–24, p. 2831–2846, 2007.
- HARUN, M.A.Y.; ROBINSON, R.W.; JOHNSON, J.; UDDIN, M.N. Allelopathic potential of *Chrysanthemoides monilifera* subsp. *monilifera* (boneseed): A novel weapon in the invasion processes. *South African Journal of Botany*, v. 93, p. 157–166, 2014.
- HOAGLAND, R.E.; ZABLOTOWICZ, R.M.; REDDY, K.N. Studies on the phytotoxicity of saponins on weed and crop plants. In: WALLER G.R.; YAMASAKI K. *Saponins Used in Food and Agriculture*. Boston: Springer, 1996. p. 57–73.
- HU, Y.; NA, X.; LI, J.; YANG, L.; YOU, J.; LIANG, X.; WANG, J.; PENG, L.; BI, Y. Narciclasine, a potential allelochemical, affects subcellular trafficking of auxin transporter proteins and actin cytoskeleton dynamics in *Arabidopsis* roots. *Planta*, v. 242, n. 6, p. 1349–1360, 2015.
- HUANG, H.; WANG, H.; VIVANCO, J.M.; WEI, S.; WU, W.; ZHANG, C. Shift of allelochemicals from *Sorghum halepense* in the soil and their effects on the soil's bacterial community. *Weed Biology and Management*, v. 17, n. 4, p. 161–168, 2017.
- HUANG, H.; YE, W.; WEI, X.; ZHANG, C. Allelopathic potential of sesquiterpene lactones and phenolic. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 36, n. 11, p. 867–871, 2009.
- HUSSAIN, M.I.; GONZÁLEZ, L.; CHIAPUSIO, G.; REIGOSA, M.J. Benzoxazolin-2(3H)-one (BOA) induced changes in leaf water relations, photosynthesis and carbon isotope discrimination in *Lactuca sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 49, n. 8, p. 825–834, 2011.
- HUSSAIN, M.I.; REIGOSA, M.J. Allelochemical stress inhibits growth, leaf water relations, PSII photochemistry, non-photochemical fluorescence quenching, and heat energy dissipation in three C₃ perennial species. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n. 13, p. 4533–4545, 2011.
- HUSSAIN, M.I.; REIGOSA, M.J. Evaluation of herbicide potential of sesquiterpene lactone and flavonoid: Impact on germination, seedling growth indices and root length in *Arabidopsis thaliana*. *Pakistan Journal of Botany*, v. 46, n. 3, p. 995–1000, 2014.
- IAS - INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY. *Constitution and bylaw of IAS*. Cádiz: IAS Newsletter, 1996.
- IBGE. Censo Agropecuário. Rio de Janeiro: IBGE, 2006.
- IBGE. Censo Agropecuário. Rio de Janeiro: IBGE, 2017.

- IMATOMI, M.; NOVAES, P.; MATOS, A.P.; GUALTIERI, S.C.J.; MOLINILLO, J.M.G.; LACRET, R.; VARELA, R.M.; MACÍAS, F.A. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 46, p. 29–35, 2013.
- INDERJIT. Exotic plant invasion in the context of plant defense against herbivores. *Plant Physiology*, v. 158, n. 3, p. 1107–1114, 2012.
- INDERJIT. Plant phenolics in allelopathy. *The Botanical Review*, v. 62, n. 2, p. 186–202, 1996.
- ITO, M.A.; CONCENÇO, G.; FREIRE MARQUES, R.; DOS SANTOS, S.A.; SANTOS ALVES, M.E.; GOMES PALHARINI, W.; MELO, T.S.; SILVA, L.B.X.; LINHARES, L.T.; CONCENÇO, S.E. Allelopathic potential of wheat on sourgrass resistant to Glyphosate. *American Journal of Plant Sciences*, v. 6, n. 7, p. 891–898, 2015.
- JANK, L.; BARRIOS, S.C.; DO VALLE, C.B.; SIMEÃO, R.M.; ALVES, G.F. The value of improved pastures to Brazilian beef production. *Crop and Pasture Science*, v. 65, n. 11, p. 1132–1137, 2014.
- JILANI, G.; MAHMOOD, S.; CHAUDHRY, A.N.; HASSAN, I.; AKRAM, M. Allelochemicals: sources, toxicity and microbial transformation in soil —a review. *Annals of Microbiology*, v. 58, n. 3, p. 351–357, 2008.
- KABERA, J.N.; SEMANA, E.; MUSSA, A.R.; HE, X. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 2, n. 7, p. 377-392, 2014.
- KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAÚJO, A. C. G. De. *Cultivares do gênero Brachiaria (Trin.) Griseb. no Brasil*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2006. 58p.
- KATO-NOGUCHI, H.; KOBAYASHI, A.; OHNO, O.; KIMURA, F.; FUJII, Y.; SUENAGA, K. Phytotoxic substances with allelopathic activity may be central to the strong invasive potential of *Brachiaria brizantha*. *Journal of Plant Physiology*, v. 171, n. 7, p. 525–530, 2014.
- KICHEL, A.N.; MIRANDA, C.H.B.; ZIMMER, A.H. Degradação de pastagens e produção de bovinos de corte com a integração agricultura X pecuária. In: *I Simpósio de Produção de Gado de Corte*. Viçosa: UFV, 1999. p. 201–234.
- KIM, Y.O.; LEE, E.J. Comparison of phenolic compounds and the effects of invasive and native species in East Asia: Support for the novel weapons hypothesis. *Ecological Research*, v. 26, n. 1, p. 87–94, 2011.

- KOBAYASHI, K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. *Weed Biology and Management*, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2004.
- KOCAÇAHÇKAN, I.; CÜNEYT UNVER, M.; TERZI, M. Effects of saponin allelochemical on amylase and polyphenol oxidase enzyme activities during germination of wheat seeds (*Triticum durum* cv. Altar). *Fresenius Environmental Bulletin*, v. 18, n. 3, p. 249–252, 2009.
- LACOUR, T.; MORIN, P. I.; SCIANDRA, T.; DONAHER, N.; CAMPBELL, D. A.; FERLAND, J.; BABIN, M. Decoupling light harvesting, electron transport and carbon fixation during prolonged darkness supports rapid recovery upon re-illumination in the Arctic diatom *Chaetoceros neogracilis*. *Polar Biology*, 2019.
- LALORAYA, M.M.; NOZZOLILLO, C.; PUROHIT, S.; STEVENSON, L.; VISHWAVIDYALAYA, D.A. Reversal of Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure by *trans*-Cinnamic and *p*-Coumaric Acid. p. 253–258, 1986.
- LATIF, S.; CHIAPUSIO, G.; WESTON, L.A. Allelopathy and the role of allelochemicals in plant defence. In: BECARD, G. *Advances in Botanical Research*, v. 82. Elsevier, 2017. p. 19-54.
- LEAL, E.S.; ÍTAVO, L.C.V.; DO VALLE, C.B.; ÍTAVO, C.C.B.F.; DIAS, A.M.; BARBOSA-FERREIRA, M.; SOARES, C.M.; DE MELO, G.K.A.; FERREIRA, V.B.N. Anti-nutritional potential of protodioscin and kinetics of degradation in *Urochloa* grasses. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 4, p. 2247–2258, 2016.
- 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.
- LIANG, X.; HE, C.; ZHU, X.; CHEN, X.; LEI, Y.; ZHANG, H.; QIN, Z.; QI, X. Effect of exotic *Spartina alterniflora* on fungal symbiosis with native plants *Phragmites australis* and *Scirpus mariqueter*, and model plants *Lolium perenne* L. and *Trifolium repens*. *Aquatic Botany*, v. 130, p. 50–58, 2016.
- LIMA, H.R.P.; KAPLAN, M.A.C. Quimiosistemática micromolecular e tendências evolutivas da superordem Zingiberiflorae (*sensu* Dahlgren). In: KAPLAN, M.A. C.; ABREU, H.S.; LIMA, H.R.P.; SOARES, G.L.G. (Ed.). *Abordagem quimiosistemática e evolução química de fanerógamas*. Seropédica: EDUR-UFRRJ, 2010. p. 231–259.
- LIU, J.; MOORE, S.; CHEN, C.; LINDSEY, K. Crosstalk complexities between auxin, cytokinin, and ethylene in Arabidopsis root development: from experiments to systems modeling, and back again. *Molecular Plant*, v. 10, n. 12, p. 1480–1496,

2017.

- LIU, L.; HE, H.; LUO, S.; LI, H. Allelopathic potential of *Rhus chinensis* on seedling growth of radish, semen cassiae and black soyabean. *Journal of Forestry Research*, v. 26, n. 2, p. 273–279, 2015.
- LIU, Q.; XU, R.; YAN, Z.; JIN, H.; CUI, H.; LU, L.; ZHANG, D.; QIN, B. Phytotoxic allelochemicals from roots and root exudates of *Trifolium pratense*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 26, p. 6321–6327, 2013.
- LIU, Y.; ZHANG, C.; WEI, S.; CUI, H.; HUANG, H. Compounds from the subterranean part of Johnsongrass and their allelopathic potential. *Weed Biology and Management*, v. 11, n. 3, p. 160–166, 2011.
- LOBO, L.T.; DA SILVA, G.A.; DE FREITAS, M.C.C.; SOUZA FILHO, A.P.S.; DA SILVA, M.N.; ARRUDA, A.C.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, L.S.; SANTOS, A.S.; ARRUDA, M.S.P. Stilbenes from *Deguelia rufescens* var. Urucu (Ducke) A. M. G. Azevedo leaves: Effects on seed germination and plant growth. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, n. 10, p. 1838–1844, 2010.
- LOZANO, M.C.; MARTINEZ, N.M.; DIAZ, G.J. Content of the saponin protodioscin in *Brachiaria* spp. from the eastern plains of Colombia. *Toxins*, v. 9, n. 7, p. 1–12, 2017.
- LÜTTGE, U.; SCARANO, F.R.; DE MATTOS, E.A.; FRANCO, A.C.; BROETTO, F.; DIAS, A.T.C.; DUARTE, H.M.; UEHLEIN, N.; WENDT, T. Does ecophysiological behaviour explain habitat occupation of sympatric *Clusia* species in a Brazilian Atlantic rainforest? *Trees - Structure and Function*, v. 29, n. 6, p. 1973–1988, 2015.
- LV, Q.; CHENG, R.; SHI, T. Regulatory network rewiring for secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana* under various conditions. *BMC Plant Biology*, v. 14, n. 180, 12p., 2014.
- MACHADO, L.A.Z.; LEMPP, B.; DO VALLE, C.B.; JANK, L.; BATISTA, L.A.R.; POSTIGLIONI, S.R.; RESENDE, R.M.S.; FERNANDEZ, C.D.; VERZIGNASSI, J.R.; VALENTIM, J.F.; ASSIS, G.M.L.; ANDRADE, C.M.S. Principais espécies forrageiras utilizadas em pastagens para gado de corte. In: PIRES, A.V. (Ed.). *Bovinocultura de corte*. Piracicaba: FEALQ, 2010. p. 375–417.
- MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.L.G.; GALINDO, J.C.G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry*, v. 68, n. 22–24, p. 2917–2936, 2007.
- MACÍAS, F.A.; MEJÍAS, F.J.R.; MOLINILLO, J.M.G. Recent advances in allelopathy

- for weed control: from knowledge to applications. *Pest Management Science*, v. 75, n. 9, p. 2413-2436, 2019.
- MACÍAS, F.A.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; MARÍN, D.; CARRERA, C.; CHINCHILLA, N.; MOLINILLO, J.M.G. Plant biocommunicators: Their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. *Phytochemistry Reviews*, v. 7, n. 1, p. 179–194, 2008.
- MACÍAS, F.A.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; MARÍN, D.; CHINCHILLA, N.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J.G. Evidence for an allelopathic interaction between rye and wild oats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 39, p. 9540–9457, 2014.
- MADANY, M.M.Y.; SALEH, A.M. Phytotoxicity of *Euphorbia helioscopia* L. on *Triticum aestivum* L. and *Pisum sativum* L. *Annals of Agricultural Sciences*, v. 60, n. 1, p. 141–151, 2015.
- MADAUS, G. Pflanzenstudien I. Ein Beitrag zur Frage der Wirkungssteigerung der Heilpflanze. *Madaus Jahresbericht*, v. 1, p. 31–36, 1937.
- MAJDA, M.; ROBERT, S. The role of auxin in cell wall expansion. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 4, p. 951, 2018.
- MALLIK, A.U.; PELLISIER, F. Effects of *Vaccinium myrtillus* on spruce regeneration: testing the notion of coevolutionary significance of allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, v. 26, n. 9, p. 2197-2209, 2000.
- MARTINS, D.; MARTINS, C.C.; COSTA, N.V. Potencial alelopático de soluções de solo cultivado com *Brachiaria brizantha*: efeitos sobre a germinação de gramíneas forrageiras e plantas daninhas de pastagens. *Planta Daninha*, v. 24, n. 1, p. 61–70, 2006.
- MATHESIUS, U. Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *Journal of Experimental Botany*, v. 52, Supl. 1, p. 419–426, 2001.
- MATOUŠKOVÁ, M.; JUROVÁ, J.; GRUL'OVÁ, D.; WAJS-BONIKOWSKA, A.; RENČO, M.; SEDLÁK, V.; PORÁČOVÁ, J.; GOGAL'OVÁ, Z.; KALEMBA, D. Phytotoxic effect of invasive *Heracleum mantegazzianum* essential oil on dicot and monocot species. *Molecules*, v. 24, n. 3, p. 3–11, 2019.
- MIGNONI, D.S.B.; SIMÕES, K.; BRAGA, M.R. Potential allelopathic effects of the tropical legume *Sesbania virgata* on the alien *Leucaena leucocephala* related to seed carbohydrate metabolism. *Biological Invasions*, v. 20, n. 1, p. 165–180, 2018.

- MOLISCH, H. *Der Einfluss eine Pflanze auf die andere Allelopathie*. Jena; Fischer, 1938.
- MORAVCOVÁ, L.; PYŠEK, P.; JAROŠIK, V.; ZÁKRAVSKÝ, P. Potential phytotoxic and shading effects of invasive *Fallopia* (Polygonaceae) taxa on the germination of native dominant species. *NeoBiota*, v. 9, p. 31–47, 2011.
- MORRONE, O.; ZULOAGA, F.O. Revision de las especies sudamericanas nativas e introducidas de los generos *Brachiaria* y *Urochloa* (Poaceae: Panocoideae: Paniceae). *Darwiniana*, v. 31, n. 1/4, p. 43–109, 1992.
- NAKAMURA, T.; KANNO, T.; MIRANDA, C.H.B.; OHWAKI, Y.; MACEDO, M.C.M. Characterization of nitrogen utilization by tropical grasses (*Brachiaria* species) in the Brazilian savannas. *JIRCAS Research Highlights*, v. 61, n. 7, p. 20–21, 1998.
- NEBO, L.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; SAMPAIO, O.M.; SEVERINO, V.G.P.; CAZAL, C.M.; FERNANDES, M.F.D.G.; FERNANDES, J.B.; MACÍAS, F.A. Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the Rutaceae and Meliaceae families. *Phytochemistry Letters*, v. 8, n. 1, p. 226–232, 2014.
- NEPOMUCENO, M.; CHINCHILLA, N.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; LACRET, R.; ALVES, P.L.C.A.; MACIAS, F.A. Chemical evidence for the effect of *Urochloa ruziziensis* on glyphosate-resistant soybeans. *Pest Management Science*, v. 73, n. 10, p. 2071–2078, 2017.
- OKSMAN-CALDENTEY, K.M.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, v. 9, n. 9, p. 433–440, 2004.
- OLESZEK, W. Allelopathic potentials of alfalfa (*Medicago sativa*) saponins: Their relation to antifungal and hemolytic activities. *Journal of Chemical Ecology*, v. 19, n. 6, p. 1063–1074, 1993.
- OLIVEIRA, A.P.P.; PEREIRA, S.R.; CÂNDIDO, A.C.S.; LAURA, V.A.; PERES, M. T.L.P. Can allelopathic grasses limit seed germination and seedling growth of Mutambo? A test with two species of *Brachiaria* grasses. *Planta Daninha*, v. 34, n. 4, p. 639–648, 2016.
- OLIVEIRA, D.R.; NEPOMUCENO, D.D.; CASTRO, R.N.; BRAZ FILHO, R.; DE CARVALHO, M.G. Special metabolites isolated from *Urochloa humidicola* (Poaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, n. 2, p. 789–797, 2017.
- OLIVEIRA, O.C. *Parâmetros químicos e biológicos relacionados com a degradação de*

pastagens de Brachiaria spp. no Cerrado brasileiro. Tese (Doutorado em Agronomia). Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2000. 153 f.

- ORACZ, K.; VOEGELE, A.; TARKOWSKÁ, D.; JACQUEMOUD, D.; TUREKOVÁ, V.; URBANOVÁ, T.; STRNAD, M.; SLIWINSKA, E.; LEUBNER-METZGER, G. Myriganone A inhibits *Lepidium sativum* seed germination by interference with gibberellin metabolism and apoplastic superoxide production required for embryo extension growth and endosperm rupture. *Plant and Cell Physiology*, v. 53, n. 1, p. 81–95, 2012.
- PAN, L.; LI, X.; YAN, Z.; GUO, H.; QIN, B. Phytotoxicity of umbelliferone and its analogs: Structure-activity relationships and action mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 97, p. 272–277, 2015.
- PAWLOWSKI, Â.; KALTCHUK-SANTOS, E.; ZINI, C.A.; CARAMÃO, E.B.; SOARES, G.L.G. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. *South African Journal of Botany*, v. 80, p. 96–103, 2012.
- PEREIRA, J.M.; TARRÉ, R.M.; MACEDO, R.; DE PAULA REZENDE, C.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Productivity of *Brachiaria humidicola* pastures in the Atlantic forest region of Brazil as affected by stocking rate and the presence of a forage legume. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v. 83, n. 2, p. 179–196, 2009.
- PÉREZ, A.J.; HUSSAIN, S.M.; PECIO, Ł.; KOWALCZYK, M.; HERLING, V.R.; STOCHMAL, A. Ultrahigh-performance liquid chromatography-high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry based metabolomics reveals key differences between *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha*, two similar pastures with different toxicities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, n. 22, p. 4686–4694, 2016.
- PÉREZ, A.J.; SIMONET, A.M.; PECIO, Ł.; KOWALCZYK, M.; CALLE, J.M.; MACÍAS, F.A.; OLESZEK, W.; STOCHMAL, A. Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Trifolium argutum* Sol. and their phytotoxic evaluation. *Phytochemistry Letters*, v. 13, p. 165–170, 2015.
- PERON, A.J.; EVANGELISTA, A.R. Degradação de pastagens em regiões de cerrado. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 28, n. 3, p. 655–661, 2004.
- PESSOA-FILHO, M.; MARTINS, A.M.; FERREIRA, M.E. Molecular dating of

- phylogenetic divergence between *Urochloa* species based on complete chloroplast genomes. *BMC Genomics*, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2017.
- PINA, G.O. *Efeito alelopático do extrato aquoso foliar de Eugenia dysenterica DC. (Myrtaceae – cagaita) na germinação, crescimento e morfo-anatomia de Sesamum indicum L. (Pedaliaceae – gergelim) e Raphanus sativus L. (Brassicaceae – rabanete)*. Dissertação (Mestrado em Botânica), Brasília, Universidade de Brasília, 2008. 119 f.
- PINZONE, P.; POTTS, D.; PETTIBONE, G.; WARREN, R. Do novel weapons that degrade mycorrhizal mutualisms promote species invasion? *Plant Ecology*, v. 219, n. 5, p. 539–548, 2018.
- PIRES, V.S.; TAKETA, A.T.C.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Saponins and saponinins from *Brachiaria decumbens* Stapf. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 13, n. 2, p. 135–139, 2002.
- PIZARRO, E.A.; VALLE, C.B.; KELLER-GREIN, G.; SCHULTZE-KRAFT, R.; ZIMMER, A.H. Regional experience with *Brachiaria*: Tropical America–Savannas. In: MILES, J.W.; MAAS, B.L.; VALLE, C.B. (Ed.). *Brachiaria: biology, agronomy, and improvement*. Cali: CIAT, 1996. p. 1–15.
- QIN, Z.; XIE, J.F.; QUAN, G.M.; ZHANG, J.; MAO, D.J.; DITOMMASO, A. Impacts of the invasive annual herb *Ambrosia artemisiifolia* L. on soil microbial carbon source utilization and enzymatic activities. *European Journal of Soil Biology*, v. 60, p. 58–66, 2014.
- RALPH, P.J.; GADEMANN, R. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic Botany*, v. 82, n. 3, p. 222–237, 2005.
- REIGOSA, M.; GOMES, A.S.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Allelopathic research in Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 27, n. 4, p. 629–646, 2013.
- RIAL, C.; GARCÍA, B.F.; VARELA, R.M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J.M.G.; MACÍAS, F.A. The joint action of sesquiterpene lactones from leaves as an explanation for the activity of *Cynara cardunculus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, n. 33, p. 6416–6424, 2016a.
- RIAL, C.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; BAUTISTA, E.; HERNÁNDEZ, A.O.; MACÍAS, F.A. Phytotoxicity evaluation of sesquiterpene lactones and diterpenes from species of the *Decachaeta*, *Salvia* and *Podachaenium* genera. *Phytochemistry Letters*, v. 18, p. 68–76, 2016b.
- RIBEIRO, R.C. *Considerações sobre a química de Brachiaria humidicola e efeitos*

- alelopáticos sobre leguminosas tropicais*. Tese (Doutorado em Química). Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2012. 122p
- RIBEIRO, R.C.; DE CARVALHO, M.G.; LOPES, H.M.; ROSSIELLO, R.O.P.; BARBIERI JUNIOR, E. Allelopathic activity of the hydrolate and water decoction of *Brachiaria humidicola* (Rendle) plant parts on the germination of four tropical leguminous species. *ISRN Agronomy*, v. 2012, p. 1–6, 2012..
- RIBEIRO, R.C.; FEITOZA, R.B.B.; LIMA, H.R.P.; CARVALHO, M.G. Phytotoxic effects of phenolic compounds on *Calopogonium mucunoides* (Fabaceae) roots. *Australian Journal of Botany*, v. 63, n. 8, p. 679–686, 2015.
- RICE, E.L. *Allelopathy*. 2nd. ed. New York: Academic Press, 1984.
- RIET-CORREA, B.; CASTRO, M.B.; DE LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, G.; MUSTAFA, V.; RIET-CORREA, F.; *Brachiaria* spp. poisoning of ruminants in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 3, p. 183–192, 2011.
- RIZVI, S.J.H.; HAQUE, H.; SINGH, V.K.; RIZVI, V. A discipline called allelopathy. In: RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. (Ed.). *Allelopathy: Basic and Applied Concepts*. 1. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 1992. p. 1–10.
- SAINI, S.; SHARMA, I.; KAUR, N.; PATI, P.K. Auxin: A master regulator in plant root development. *Plant Cell Reports*, v. 32, n. 6, p. 741-757, 2013.
- SALARIATO, D.L.; ZULOAGA, F.O.; GIUSSANI, L.M.; MORRONE, O. Molecular phylogeny of the subtribe Melinidinae (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) and evolutionary trends in the homogenization of inflorescences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 56, n. 1, p. 355–369, 2010.
- SAMPAIO, O.M.; VIEIRA, L.C.C.; BELLETE, B.S.; KING-DIAZ, B.; LOTINA-HENNSEN, B.; DA SILVA, M.F.D.G.F.; VEIGA, T.A.M. Evaluation of alkaloids isolated from *Ruta graveolens* as photosynthesis inhibitors. *Molecules*, v. 23, n. 10, p. 1–12, 2018.
- SANTOS, L.S.; SANTOS, J.C.L.; SOUZA FILHO, A.P.S.; CORRÊA, M.J.C.; VEIGA, T.A.M.; FREITAS, V.C.M.; FERREIRA, I.C.S.; GONÇALVES, N.S.; SILVA, C.E.; GUILHON, G.M.S.P. Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas do Capim-Marandu e suas variações em função do pH. *Planta Daninha*, v. 26, n. 3, p. 531–538, 2008.
- SCOGNAMIGLIO, M.; D'ABROSCA, B.; ESPOSITO, A.; PACIFICO, S.; MONACO, P.; FIORENTINO, A. Plant growth inhibitors: Allelopathic role or phytotoxic effects? Focus on Mediterranean biomes. *Phytochemistry Reviews*, v. 12, n. 4, p.

803-830, 2013.

- SEIFFERT, N.F. Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1980. 83p.
- SENARATHNE, S.H.S.; DISSANAYAKA, D.N.M.; VIDHANA ARACHCHI, L.P. Allelopathic potential of *Brachiaria brizantha* and *B. milliformis* on seed germination of selected bioassay species. *Pakistan Journal of Weed Science Research*, v. 16, n. 2, p. 207–216, 2010.
- SHAH, A.N.; IQBAL, J.; ULLAH, A.; YANG, G.; YOUSAF, M.; FAHAD, S.; TANVEER, M.; HASSAN, W.; TUNG, S.A.; WANG, L.; KHAN, A.; WU, Y. Allelopathic potential of oil seed crops in production of crops: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 15, p. 14854–14867, 2016.
- SHANNON-FIRESTONE, S.; FIRESTONE, J. Allelopathic potential of invasive species is determined by plant and soil community context. *Plant Ecology*, v. 216, n. 3, p. 491–502, 2015.
- SHITAN, N. Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 80, n. 7, p. 1283-1293, 2016.
- SILVA, E.A.S.; LÔBO, L.T.; SILVA, G.A.; SOUZA FILHO, A.P.S.; DA SILVA, M.N.; ARRUDA, A.C.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, L.S.; ARRUDA, M.S.P. Flavonoids from leaves of *Derris urucu*: Assessment of potential effects on seed germination and development of weeds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 85, n. 3, p. 881–889, 2013.
- SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KAUR, S.; ARORA, K.; KOHLI, R.K. α -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. *Annals of Botany*, v. 98, n. 6, p. 1261–1269, 2006.
- SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Allelopathy in Agroecosystems. *Journal of Crop Protection*, v. 4, n. 2, p. 1–41, 2001.
- SINGH, H.P.; KAUR, S.; MITTAL, S.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Essential oil of *Artemisia scoparia* inhibits plant growth by generating reactive oxygen species and causing oxidative damage. *Journal of Chemical Ecology*, v. 35, n. 2, p. 154–162, 2009.
- SOUZA-ALONSO, P.; RODRÍGUEZ, J.; GONZÁLEZ, L.; LORENZO, P. Here to stay. Recent advances and perspectives about *Acacia* invasion in Mediterranean areas. *Annals of Forest Science*, v. 74, n. 3, p. 1–20, 2017.
- SOUZA FILHO, A.P.S. Proposta metodológica para análise da ocorrência de sinergismo

- e efeitos potencializadores entre aleloquímicos. *Planta Daninha*, v. 24, n. 3, p. 607–610, 2006.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; RODRIGUES, L.R.; RODRIGUES, T.D. Inibição da germinação e alongamento da radícula de invasoras de pastagens pelos extratos aquosos de gramíneas forrageiras tropicais. *Pasturas Tropicais*, v. 19, n. 1, p. 45–50, 1997.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; PEREIRA, A.A.G.; BAYMA, J.C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. *Planta Daninha*, v. 23, n. 1, p. 25–32, 2005.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, L.S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório - revisão crítica. *Planta Daninha*, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.
- SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; ISHIKAWA, T.; YOSHIHASHI, T.; ITO, O.; ONO, H.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; KAWANO, N.; BERRY, W.L. Free fatty acids from the pasture grass *Brachiaria humidicola* and one of their methyl esters as inhibitors of nitrification. *Plant and Soil*, v. 313, n. 1–2, p. 89–99, 2008.
- SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M.P.; ONO, H.; MORETA, D.E.; SALCEDO, A.F.; YOSHIHASHI, A.T.; ISHIKAWA, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I.M.; LASCANO, C.E.; BERRY, W.L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 41, p. 17302–17307, 2009.
- SUKSUNGWORN, R.; SRISOMBAT, N.; BAPIA, S.; SOUN-UDOM, M.; SANEVAS, N.; WONGKANTRAKORN, N.; KERMANEE, P.; VAJRODAYA, S.; DUANGSRISAI, S. Coumarins from *Haldina cordifolia* lead to programmed cell death in giant mimosa: Potential bio-herbicides. *Pakistan Journal of Botany*, v. 49, n. 3, p. 1173–1183, 2017.
- SULLIVAN, C.A.O.; WHISSON, K.; TREBLE, K.; ROPER, M.M.; MICIN, S.F.; WARD, P.R. Biological nitrification inhibition by weeds: Wild radish, brome grass, wild oats and annual ryegrass decrease nitrification rates in their rhizospheres. *Crop and Pasture Science*, v. 68, n. 8, p. 798–804, 2017.
- SUNMONU, T.O.; VAN STADEN, J. Phytotoxicity evaluation of six fast-growing tree species in South Africa. *South African Journal of Botany*, v. 90, p. 101–106, 2014.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5. ed., Artmed, 2013. 918p.
- TAKAHASHI, L.; SERT, M.A.; KELMER-BRACHT, A.M.; BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. Effects of rutin and quercetin on mitochondrial metabolism and on ATP levels in germinating tissues of *Glycine max*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 36, n. 7, p. 495-501, 1998.
- TEALE, W.D.; PAPONOV, I.A.; DITENGOU, F.; PALME, K. Auxin and the developing root of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, v. 123, n. 2, p. 130–138, 2005.
- TETALI, S.D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. *Planta*, v. 249, n. 1, p. 1-8, 2019.
- THAKUR, M.; MELZIG, M.F.; FUCHS, H.; WENG, A. Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. *Botanics: Targets and Therapy*, v. 1, p. 19–29, 2011.
- THE PLANT LIST. *Version 1.1*. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 2 fev. 2019.
- THIÉBAUT, G.; TARAYRE, M.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, H. Allelopathic effects of native *versus* invasive plants on one major invader. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, n. 854, 10p., 2019.
- THOMAS, P.A.; SCHÜLER, J.; BOAVISTA, L.R.; TORCHELSEN, F.P.; OVERBECK, G.E.; MÜLLER, S.C. Controlling the invader *Urochloa decumbens*: Subsidies for ecological restoration in subtropical Campos grassland. *Applied Vegetation Science*, v. 22, n. 1, p. 96–104, 2019.
- THORPE, A.S.; THELEN, G.C.; DIACONU, A.; CALLAWAY, R.M. Root exudate is allelopathic in invaded community but not in native community: Field evidence for the novel weapons hypothesis. *Journal of Ecology*, v. 97, n. 4, p. 641–645, 2009.
- TORRES GONZÁLEZ, A.M.; MORTON, C.M. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 37, n. 1, p. 36–44, 2005.
- UDDIN, M.N.; ROBINSON, R.W. Allelopathy and resource competition: the effects of *Phragmites australis* invasion in plant communities. *Botanical Studies*, v. 58, n. 1, p. 29, 2017.
- VILLA-RUANO, N.; PACHECO-HERNÁNDEZ, Y.; RUBIO-ROSAS, E.; RUIZ-GONZÁLEZ, N.; CRUZ-DURAN, R.; LOZOYA-GLORIA, E.; ZURITA-VÁSQUEZ, G.; FRANCO-MONSREAL, J. Alkaloid profile, antibacterial and

- allelopathic activities of *Lupinus jaimehintoniana* B.L. Turner (Fabaceae). *Archives of Biological Sciences*, v. 64, n. 3, p. 1065–1072, 2012.
- VOKOU, D.; DOUVLI, P.; BLIONIS, G.J.; HALLEY, J.M. Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. *Journal of Chemical Ecology*, v. 29, n. 10, p. 2281–2301, 2003.
- WANG, C.M.; CHEN, H.T.; LI, T.C.; WENG, J.H.; JHAN, Y.L.; LIN, S.X.; CHOU, C.H. The role of pentacyclic triterpenoids in the allelopathic effects of *Alstonia scholaris*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 40, n. 1, p. 90–98, 2014.
- WANG, C.M.; LI, T.C.; JHAN, Y.L.; WENG, J.H.; CHOU, C.H. The Impact of microbial biotransformation of catechin in enhancing the allelopathic effects of *Rhododendron formosanum*. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, p. 1–14, 2013.
- WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.; SCHMÜLLING, T. Cytokinin-deficient transgenic arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*, v. 15, n. 11, p. 2532–2550, 2003.
- WILLIS, R.J. *The history of allelopathy*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, v. 64, n. 1, p. 3–19, 2003.
- XU, R.; FAZIO, G.C.; MATSUDA, S.P.T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*, v. 65, n. 3, p. 261–291, 2004.
- XU, S.; YANG, S.Q.; YANG, Y.J.; XU, J.Z.; SHI, J.Q.; WU, Z.X. Influence of linoleic acid on growth, oxidative stress and photosynthesis of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, v. 51, n. 2, p. 223–236, 2017.
- YANG, L.; WEN, K.S.; RUAN, X.; ZHAO, Y.X.; WEI, F.; WANG, Q. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, v. 23, n. 4, p. 1–26, 2018.
- YE, S.F.; ZHOU, Y.H.; SUN, Y.; ZOU, L.Y.; YU, J.Q. Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots, and promotes incidence of *Fusarium* wilt. *Environmental and Experimental Botany*, v. 56, n. 3, p. 255–262, 2006.
- ZHANG, K.M.; SHEN, Y.; ZHOU, X.Q.; FANG, Y.M.; LIU, Y.; MA, L.Q. Photosynthetic electron-transfer reactions in the gametophyte of *Pteris multifida* reveal the presence of allelopathic interference from the invasive plant species

Bidens pilosa. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 158, p. 81–88, 2016.

ZHAO, M.; CHENG, J.; GUO, B.; DUAN, J.; CHE, C. Momilactone and related diterpenoids as potential agricultural chemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, n. 30, p. 7859–7872, 2018.

ZHU, W.; LIU, J.; YE, J.; LI, G. Effects of phytotoxic extracts from peach root bark and benzoic acid on peach seedlings growth, photosynthesis, antioxidance and ultrastructure properties. *Scientia Horticulturae*, v. 215, p. 49–58, 2017.