

Resposta do Sistema Antioxidante e Fisiologia da Germinação de Sementes de *Phaseolus Vulgaris* L. Sob Ação de Extrato Aquoso de *Bauhinia Forficata* Link.

Erly C. Porto ¹

Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz ²

Guilherme de Almeida Garcia Rodrigues ³

Maiara Iadwizak Ribeiro ⁴

Jaqueline Malagutti Corsato ⁵

Andrea Maria Teixeira Fortes ⁶

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes proporções de extrato aquoso de *Bauhinia forficata* L. sobre o processo fisiológico germinativo e a atividade enzimática de sementes de feijão no decorrer da germinação. Os tratamentos foram compostos pelas proporções 0 (água); 2,5; 5; 7,5 e 10% (folhas secas da *B. forficata*) e pelas horas de embebição das sementes. O delineamento foi inteiramente casualizado com fator duplo. Foram avaliados a germinação, o índice de velocidade de germinação, o tempo médio de germinação, o índice alelopático (RI), a atividade das enzimas superóxido-dismutase, catalase e peroxidase. O índice de velocidade e o tempo médio de germinação como também o índice alelopático foram afetados negativamente conforme o aumento das proporções de extrato testadas. Observamos que nos cotilédones das sementes de feijão o início da embebição apresentou atividade das enzimas avaliadas superiores aos valores encontrados no final do processo germinativo, enquanto que no eixo embrionário os maiores valores foram verificados no final do processo germinativo. O aumento das proporções de extrato das folhas de *B. forficata* afetaram as atividades enzimáticas no processo germinativo das sementes de feijão resultando em um atraso da germinação.

Palavras-chave: alelopatia, enzimas antioxidantes, germinação

¹ Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste. Cascavel, Paraná, Brasil. erly.carlos@gmail.com

² Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste. Cascavel, Paraná, Brasil. emzluz@gmail.com

³ Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste. Cascavel, Paraná, Brasil. guilhermegarciax@gmail.com

⁴ Doutoranda em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Departamento de Sementes, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo, Brasil. maiara_maa@hotmail.com

⁵ Docente na Universidade Estadual do Centro Oeste do Paraná, Unicentro. Guarapuava, Paraná, Brasil. corsato.jm@gmail.com

⁶ Docente na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste. Cascavel, Paraná, Brasil. amtfortes@unioeste.br

A alelopatia é um fenômeno químico biológico, pois seus produtos são metabólitos químicos produzidos por plantas ou micro-organismos durante o crescimento, desenvolvimento e distribuição desses organismos nas comunidades naturais ou em sistemas agrícolas. A maioria dos aleloquímicos são produtos do metabolismo secundário das plantas (Rezende et al. 2003; Blanco 2007; Cheng & Cheng, 2015). Os compostos alelopáticos se originam direta ou indiretamente no meio ambiente por meio da exsudação das raízes, lixiviação, volatilização e decomposição da planta doadora (Ferreira e Aquila 2000).

Esses compostos bioquímicos por sua vez, podem estimular ou inibir o crescimento e o desenvolvimento de sistemas biológicos ao seu redor. A interação alelopática pode ser um dos fatores que contribuem para a distribuição e abundância de espécies dentro de comunidades (Reigosa et al. 1999; Cheng & Cheng 2015). Os mecanismos de ação dos aleloquímicos pode afetar processos vitais de outras plantas, como a germinação, respiração, fotossíntese, atividade enzimática, divisão e alongamento celular, visto que muitos desses processos ocorrem em função do estresse oxidativo (Blanco 2007).

O processo de germinação de uma semente se caracteriza pela reativação do seu metabolismo, que tem início com a entrada da água e finaliza com a protrusão da raiz primária, esse processo de reativação do metabolismo fisiológico da semente, gera uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Cruz-Ortega et al. 2002; Bewley et al. 2013). O acúmulo dessas EROs, mediado pela presença de aleloquímicos podem levar a danos no crescimento e desenvolvimento dos vegetais (Gniazdowska et al. 2015). Estudos de Gniazdowska & Bogatek (2005) e Cruz-Ortega et al. (2007) relatam que, a ação de compostos aleloquímicos desencadeiam o aumento da produção de radicais livres causando assim diversos danos celulares.

A alta taxa de espécies reativas nas células vegetais ativa um sistema de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a peroxidase (POD), tais enzimas atuam para manter a homeostase dessas EROs nas células, evitando assim que ocorra danos ao crescimento e desenvolvimento da planta que em muitas vezes podem levar a morte celular (Alscher et al. 2002; Gniazdowska & Bogatek 2005; Almeida et al. 2008; Barbosa et al. 2014).

Conhecida popularmente como pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* L.), essa espécie é indicada para recuperação de áreas degradadas, por apresentar uma rápida germinação e suportar inundações de curto prazo. (Lorenzi 2002). Alguns estudos com a espécie *Bauhinia forficata* L. já demonstraram

Resposta do sistema antioxidante e fisiologia da germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. sob ação de extrato aquoso de *Bauhinia forficata* Link.

Erly C. Porto, Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz, Guilherme de Almeida Garcia Rodrigues, Maiara Iadwizak Ribeiro, Jaqueline Malagutti Corsato e Andrea Maria Teixeira Fortes
interferência negativa, de compostos alelopáticos encontrados no seu extrato (Manoel et al. 2009; Meira et al. 2016).

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a ação do extrato aquoso das folhas de *B. forficata* L. na resposta do sistema antioxidante e na fisiologia das sementes de *Phaseolus vulgaris* L. em diferentes fases do processo de germinação.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste *Campus* Cascavel – PR, no período de novembro de 2016 a abril de 2017.

Para a avaliação do efeito do extrato de *B. forficata* sobre a germinação e a atividade enzimática, foram utilizadas sementes de feijão (*P. vulgaris* L.) cultivar IAC Milênio, adquiridas de um produtor rural local (25°05'19.9" S, 53°19'33.8" W) em Cascavel, Paraná, Brasil. A escolha pela espécie do feijão se deu pelo fato de ser uma semente já padronizada pela literatura e pela facilidade para separação do tecido de reserva e eixo embrionário. As sementes de feijão foram submetidas a assepsia durante 10 minutos em solução de água destilada com solução de detergente neutro (5 gotas para cada 100ml de água destilada), segundo Brasil (2009).

COLETA DAS FOLHAS

As folhas de *Bauhinia forficata*, foram colhidas em dezembro de 2016, período em que se encontram em pré-floração, no período da manhã, em área de vegetação nativa do Parque Nacional do Iguaçu, próximo ao município de Lindoeste – PR (25°18'38.6" S, 53°38'01.6" W). As exsiccatas da *B. forficata* foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP), campus Cascavel, sob número 2360.

Após a coleta, as folhas foram secas em estufa com ventilação forçada de ar à temperatura de 40±2 °C até que uma massa seca estável fosse obtida. Em seguida a matéria seca foi triturada em moinho de facas do tipo Willey®, para a obtenção do pó, armazenado em frascos de vidro envoltos por papel alumínio para evitar foto-oxidação.

PREPARAÇÃO DO EXTRATO

O extrato foi obtido a partir do pó das folhas trituradas de *B. forficata*, utilizando as proporções de 25; 50; 75 e 100g de pó para 1000 mL de água destilada, relação peso/volume (g mL⁻¹). A mistura foi

Resposta do sistema antioxidante e fisiologia da germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. sob ação de extrato aquoso de *Bauhinia forficata* Link.

Erly C. Porto, Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz, Guilherme de Almeida Garcia Rodrigues, Maiara Iadwizak Ribeiro, Jaqueline Malagutti Corsato e Andrea Maria Teixeira Fortes homogeneizada por cerca de 1 minuto, em seguida foi deixada em repouso por 4 horas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), no escuro (Carvalho et al. 2012).

Posteriormente, o extrato foi filtrado em um pano de algodão, constituindo os extratos nas proporções de 2,5%; 5%; 7,5% e 10%, esses 4 tratamentos com extratos de *B. forficata* e mais um, composto apenas por água destilada (0%), totalizando 5 tratamentos.

O potencial hidrogeniônico (pH) de todas as proporções do extrato aquoso utilizado foi medido com pHmetro Micronal B474. Foi determinado também o potencial osmótico, adaptado de Villela et al. (1991), utilizando concentrações conhecidas de polietileno glicol (PEG 6000), em que foi determinado os valores de Brix de refração em refratômetro de bancada.

A partir destas leituras foi ajustada uma reta de regressão linear que possibilitou estimar o potencial osmótico das proporções do extrato, a partir dos valores de Brix, adaptado de Daneluzzi et al. (2014).

GERMINAÇÃO

Para o teste de germinação, foram utilizados os 5 tratamentos citados acima. As sementes de *P. vulgaris* foram dispostas em papel Germitest®, previamente autoclavados, 50 sementes por repetição, sendo 4 repetições dentro de cada tratamento e posteriormente umedecido com os extratos na proporção de 2,5 vezes o peso do papel Germitest® seco (Brasil 2009). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com fator único de cinco níveis, correspondentes as proporções (0; 2,5; 5; 7,5 e 10 %) do extrato aquoso de *B. forficata*, com 4 repetições de 50 sementes de *P. vulgaris* cada.

Os experimentos foram mantidos em câmara de germinação tipo B.O.D a 25 ± 1 ° C com fotoperíodo de 12 horas (Brasil 2009). A contagem do teste de germinação foi realizada diariamente, considerando como germinada as sementes que apresentaram 2 mm de raiz primária, a leitura foi realizada até a estabilização da germinação, totalizando sete dias após a semeadura (Laboriau 1983).

Para as análises de germinação foram analisadas as variáveis: porcentagem de germinação (Brasil 2009), índice de velocidade de germinação (IVG) segundo Silva e Nakagawa (1995) e tempo médio de germinação (TMG) conforme Edmond e Drapala (1958). O índice de resposta a efeitos alelopáticos (RI) foi calculado de acordo com Gao et al. (2009), pela seguinte equação: $RI = 1 - C/T$ ($T \geq C$) ou $RI = T/C - 1$ ($T < C$); em que: C = velocidade de germinação do controle (ou testemunha) e T = velocidade de germinação do tratamento.

Resposta do sistema antioxidante e fisiologia da germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. sob ação de extrato aquoso de *Bauhinia forficata* Link.

Erly C. Porto, Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz, Guilherme de Almeida Garcia Rodrigues, Maiara Iadwizak Ribeiro, Jaqueline Malagutti Corsato e Andrea Maria Teixeira Fortes

ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a análise da atividade enzimática foram utilizados os 5 tratamentos dos extratos citados acima e foram determinados 5 tempos de coletapontos de coleta: 3, 6, 9, 12 e 24 horas após a embebição das sementes, com base na curva de embebição das sementes de *P. vulgaris* (Silva et al. 2014).

Foram dispostas 50 sementes de *P. vulgaris* em papel germitest, previamente autoclavados a 121 °C, 20 minutos, 50 sementes por repetição, sendo 4 repetições dentro de cada tratamento de extrato e cada tratamento de horas de embebição.

O papel Germitest® utilizado como substrato foi umedecido com os extratos na proporção de 2.5 vezes o peso do papel seco. Foi realizada a quantificação da atividade enzimática tanto para o tecido de reserva (cotilédone) das sementes, quanto para o eixo embrionário.

Assim, os cotilédones (50 mg) foram macerados em gral e pistilo com nitrogênio líquido, contendo 1% de polivinilpirrolidona (PVPP) em solução de tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹ pH 6,8. O homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm por 30 minutos a 4 ° C. A quantificação de proteínas totais foi realizada de acordo com Bradford (1976), para a determinação da atividade específica das enzimas.

A análise da atividade específica das enzimas antioxidantes foram: superóxido dismutase (SOD) adaptado de acordo com Beuchamp e Fridovich (1971), em U/mg de proteína; Catalase (CAT) adaptado conforme Azevedo et al. (1998), em nmol H₂O₂ consumido min⁻¹mg⁻¹ proteína; Peroxidase (POD) adaptado de acordo com Teisseire e Guy (2000), em μmol de purpurogalina min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados que não atenderam as suposições associadas ao modelo estatístico de normalidade e homocedasticidade, como a atividade enzimática da peroxidase do tecido de reserva (cotilédone) foram transformados em ($\sqrt{x+0.5}$), atendendo posteriormente as suposições associadas ao modelo estatístico.

Em seguida, foi realizado a análise de regressão para as análises fisiológicas (IVG e TMG) por meio do ajuste de modelos simples e polinomiais (de segunda a quarta ordem). Já os testes bioquímicos (atividade enzimática) foram comparados pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram geradas pelo software livre R studio 3.2.2.

Resposta do sistema antioxidante e fisiologia da germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. sob ação de extrato aquoso de *Bauhinia forficata* Link.

Erly C. Porto, Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz, Guilherme de Almeida Garcia Rodrigues, Maiara Iadwizak Ribeiro, Jaqueline Malagutti Corsato e Andrea Maria Teixeira Fortes

O delineamento experimental para análise da atividade enzimática, foi inteiramente casualizado, com 4 repetições, em esquema fatorial 5x5, com um dos fatores constituído pelas cinco proporções (0%; 2.5%; 5%; 7.5% e 10%) do extrato aquoso de *B. forficata*, o outro fator, pelos cinco tempos após a embebição (3; 6; 9; 12 e 24h). Totalizando assim 25 tratamentos com 4 repetições cada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS FISIOLÓGICOS

A caracterização dos tratamentos de extrato aquoso quanto ao pH e potencial osmótico apresentaram valores dentro dos parâmetros indicados para a germinação de *P. vulgaris*. Os valores obtidos para o pH, variaram de 6,22 a 7,7. Segundo Ferreira e Aquila (2000), apenas valores muito extremos, ácidos ou alcalinos podem interferir no processo de germinação com efeitos prejudiciais, indicando assim, que houve pouca variação dessas variáveis.

Para os valores dos potenciais osmóticos, estes variaram de -0,0142 a -0,003 MPa. Segundo Viçosi et al. (2017), as sementes de feijão apresentam redução de germinação e comprimento de radícula a -0.6 MPa. Os extratos aquosos podem conter determinadas substâncias que podem alterar a propriedade da água, diferindo da pressão osmótica de zero na solução podendo mascarar os efeitos alelopáticos dos extratos, sendo osmoticamente ativos (Carvalho et al. 2014), ofato este que não ocorreu no presente trabalho.

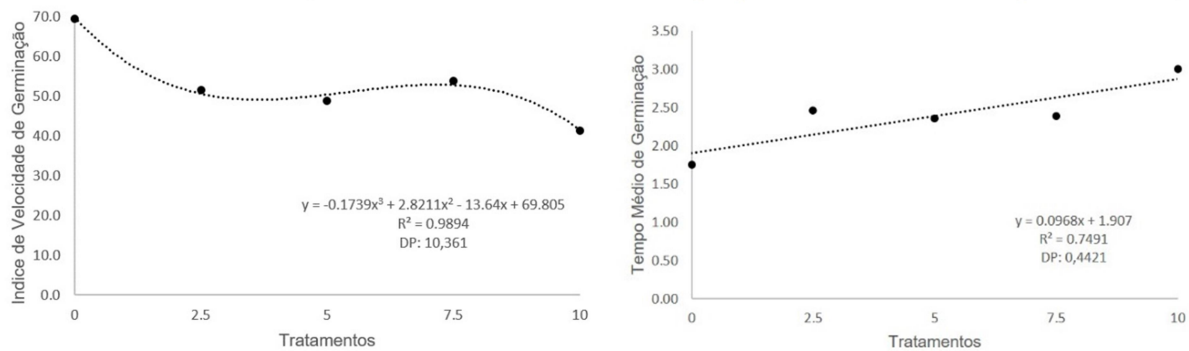
Para a variável porcentagem de germinação os valores obtidos indicaram que os tratamentos não diferiram entre si, uma vez que foi obtido 100% de germinação das sementes de feijão. Resultados semelhantes foram verificados em trabalhos realizados com a *B. unguilata* L. e *B. forficata* sobre a germinação de sementes de alface, cebola e tomate, os quais também não identificaram interferência na porcentagem de germinação, do extrato dessas espécies sobre as sementes utilizadas (Manoel et al. 2009; Paula et al. 2015).

Alguns efeitos alelopáticos podem ser mais evidentes durante a distribuição temporal da germinação e no retardo do tempo médio da germinação das sementes (Ferreira & Aquila, 2000). Neste contexto, para as variáveis índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de germinação (TMG) obtivemos resultados que indicam uma maior ação alelopática dos extratos, verificadas nas proporções 5 e 10% para o IVG e 10% para o TMG, possivelmente, devido a maior proporção de compostos nos extratos das folhas secas de *B. forficata* (Tabela 1).

Resposta do sistema antioxidante e fisiologia da germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. sob ação de extrato aquoso de *Bauhinia forficata* Link.

Erly C. Porto, Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz, Guilherme de Almeida Garcia Rodrigues, Maiara Iadwizak Ribeiro, Jaqueline Malagutti Corsato e Andrea Maria Teixeira Fortes

Figura 1: Índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) das sementes de *Phaseolus vulgaris*, submetidas a diferentes proporções do extrato aquoso de *B. forficata*.



O IVG das sementes de *P. vulgaris*, apresentou tendência a uma menor velocidade de germinação em todos os tratamentos onde se tinha presença do extrato e isto fica mais evidente nos extratos 5 e 10 %, com IVG de 48,86 e 41,42 respectivamente, sendo menor que o tratamento 0 %, o qual apresentou um IVG de 69,55 (Figura 1).

De modo semelhante, Manoel et al. (2009), observaram que o extrato seco de folhas de *B. forficata* também atrasou a velocidade média da germinação de sementes de tomate, essa redução foi maior conforme o aumento das concentrações utilizadas. Alguns autores afirmam que o índice de velocidade de germinação é o indicador fisiológico mais sensível aos efeitos alelopáticos, comparados com a porcentagem de germinação, visto que, o IVG identifica esses efeitos ao longo da germinação, e não somente ao final dela (Wardle et al. 1991; Souza Filho et al. 1996; Rizzardi et al. 2008).

Com relação ao tempo médio de germinação (TMG), observamos que, com o aumento das proporções de extrato testadas houve também um aumento no tempo médio de germinação das sementes de *P. vulgaris*, fato este que, confirma os dados obtidos no IVG, uma vez que são inversamente proporcionais. Verificamos que as sementes do tratamento 10 % apresentaram maior TMG, levando em média três dias para germinar, 1,5 vezes a mais do que o tratamento 0 %, que apresentou 1,75 dias.

O nível de inibição dos compostos aleloquímicos é dependente da sua proporção dentro das diluições do extrato, quando em baixas proporções, as substâncias alelopáticas podem não interferir na germinação de outras espécies, enquanto que em altas proporções, muitas vezes, exercem ação inibitória, ocasionando assim um efeito dose dependente (Harper & Balke 1981; Rice 1984).

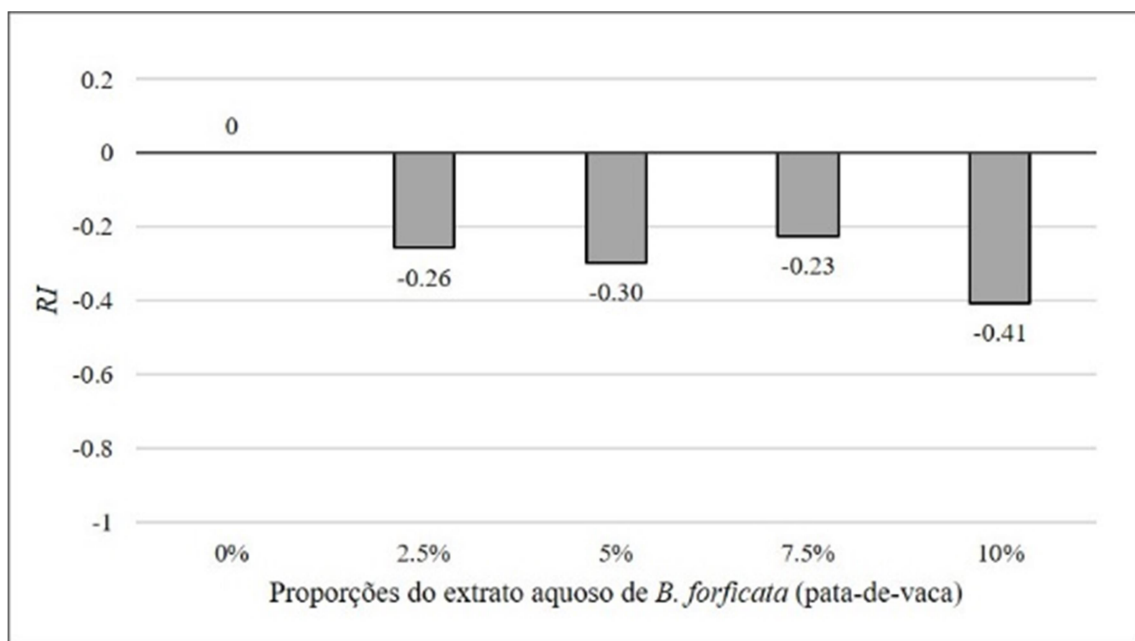
Esses resultados corroboram com o verificado por Maraschin-Silva e Aquila (2006), que obtiveram o tempo médio de germinação prolongado de aquênios de alface submetidas ao extrato

Resposta do sistema antioxidante e fisiologia da germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. sob ação de extrato aquoso de *Bauhinia forficata* Link.

Erly C. Porto, Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz, Guilherme de Almeida Garcia Rodrigues, Maiara Iadwizak Ribeiro, Jaqueline Malagutti Corsato e Andrea Maria Teixeira Fortes
aquoso de 4% de *Peltophorum dubium*, uma Fabaceae assim como *B. forficata*, porém sem efeito na porcentagem de germinação. Da mesma forma, Manoel et al. (2009) observaram que extratos de *B. forficata* não interferiram na porcentagem de germinação das sementes de tomate, porém houve aumento significativo no tempo médio de germinação quando submetidas aos extratos.

Quanto ao índice de resposta ao efeito alelopático (RI), este indica estímulo de germinação caso apresente valores positivos em relação ao controle, enquanto que valores negativo estão relacionados, possivelmente a uma inibição, indicando que o extrato de *B. forficata* exerceu forte efeito inibitório sobre o processo de germinação (Figura 2). Da mesma forma, Meira et al. (2016), trabalhando com *Cajanus cajan*, uma leguminosa assim como *B. forficata*, observou valores negativos para as proporções de extratos utilizadas.

Figura 2: Índice de resposta a efeitos alelopáticos (RI) das diferentes proporções do extrato aquoso de *B. forficata* L. sobre a germinação das sementes de *P. vulgaris*.



ATIVIDADE ENZIMÁTICA NOS COTILÉDONES

Observamos que a atividade da SOD nos cotilédones de *P. vulgaris*, foi elevada para os tratamentos 0%, com 6 horas de embebição (5,12 U / mg de proteína), e 5 % em 3 horas de embebição (4,68 U / mg de proteína), seguido de uma redução nesses mesmos tratamentos a partir de 9 e 6 horas, respectivamente (Tabela 2). Já para os intervalos de embebição, verificamos que houve diferença significativa para as diferentes proporções do extrato testadas nos tempos de 6, 9 e 24 horas.

Resposta do sistema antioxidante e fisiologia da germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. sob ação de extrato aquoso de *Bauhinia forficata* Link.

Erly C. Porto, Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz, Guilherme de Almeida Garcia Rodrigues, Maiara Iadwizak Ribeiro, Jaqueline Malagutti Corsato e Andrea Maria Teixeira Fortes
Observamos que a atividade da SOD com 9 horas na presença do extrato 2,5 % dobrou em relação à testemunha, e houve uma redução na atividade dessa enzima com 6 e 24 horas para o extrato 5 % (Tabela 2).

Tabela 1: Atividade enzimática das enzimas Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Peroxidase (POD) dos cotilédones das sementes de *P. vulgaris* L. em 3, 6, 9, 12 e 24 horas de embebição, submetidas as diferentes proporções de extrato aquoso de *B. forficata* L.

SOD (U/mg de proteína)						
Tratamentos	3h	6h	9h	12h	24h	
0 %	3,82 aB	5,12 aA	2,42 bB	3,40 aB	3,54 aB	
2.5 %	3,85 aA	3,73 aA	4,89 aA	2,84 aA	3,38 aA	
5 %	4,68 aA	2,93 bB	2,84 bB	3,15 aB	1,61 bB	
7,5 %	3,22 aA	4,07 aA	2,65 bA	2,66 aA	4,36 aA	
10 %	2,88 aA	2,25 bA	3,02 bA	2,97 aA	3,39 aA	
CV (%)	31,55					
CAT (H ₂ O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína)						
0 %	108,44 aA	6,73 aB	4,11 aB	6,36 aB	16,25 aB	
2.5 %	104,38 aA	6,34 aB	5,93 aB	5,02 aB	5,76 aB	
5 %	121,96 aA	4,10 aB	3,87 aB	3,65 aB	3,36 aB	
7,5 %	17,00 bA	4,74 aA	3,94 aA	2,79 aA	7,99 aA	
10 %	11,74 bA	3,39 aA	32,49 aA	2,56 aA	10,35 aA	
CV(%)	49,88					
POD (µmol de purpurogalina min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína)						Média
0 %	0,106	0,096	0,034	0,099	0,110	0,0895 a
2.5 %	0,136	0,076	0,062	0,080	0,142	0,0998 a
5 %	0,108	0,082	0,130	0,098	0,131	0,1105 a
7,5 %	0,088	0,066	0,060	0,065	0,129	0,0823 a
10 %	0,082	0,039	0,061	0,074	0,075	0,0668 a
Média	0,1045 A	0,0723 B	0,0701 B	0,0839 B	0,1181 A	
CV (%)	3,88					

*Médias dos tratamentos seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade (p<0.05). C.V: coeficiente de variação.

Para a atividade da CAT nos cotilédones das sementes de *P. vulgaris*, verificamos uma atividade a partir de 6 horas de embebição, tanto para a testemunha (0%) quanto para os extratos nas proporções 2,5 e 5 %. Quando analisada a atividade dessa enzima nos períodos embebição, observamos que, apenas com 3 horas de embebição houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo que as proporções 7,5 e 10% reduziram em 10 vezes a atividade da enzima (Tabela 1).

A atividade da POD não apresentou interação entre os fatores de proporções de extrato e de horas de embebição, porém a média para o fator horas de embebição indicou que independente da proporção de extrato utilizada, após 6, 9 e 12 horas de embebição ocorre uma redução na atividade específica dessa enzima, seguida de um aumento com 24 horas de embebição (Tabela 1).

Resposta do sistema antioxidante e fisiologia da germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. sob ação de extrato aquoso de *Bauhinia forficata* Link.

Erly C. Porto, Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz, Guilherme de Almeida Garcia Rodrigues, Maiara Iadwizak Ribeiro, Jaqueline Malagutti Corsato e Andrea Maria Teixeira Fortes
Segundo Gniazdownska et al. (2015), nas primeiras horas de embebição, com a reativação da cadeia de transporte de elétrons da respiração, na presença dos extratos utilizados, estes podem ter estimulado em uma maior atividade da SOD. Assim como a SOD, a CAT também acompanhou a alta atividade enzimática ao começo do processo germinativo no cotilédone, em 3 e 6 horas. Como proposto por Alscher et al. (2002) a enzima superóxido dismutase (SOD), atua na primeira linha de defesa para conter os radicais livres, transformando o $O^{\cdot -}$ em H_2O_2 , que por sua vez são transformados em água e oxigênio molecular pela POD e CAT.

Desta forma o atraso da atividade da peroxidase, pode ser devido ao mecanismo compensatório sugerido por Apel e Hirt (2014), por exemplo, quando a atividade da catalase é alta, outras enzimas são expressas em menores quantidades. Tal fato é observado em nossos resultados, com a alta atividade da catalase em 6 e 9 horas de embebição e apenas com 24 horas de embebição foi observado alta atividade da peroxidase.

Os cotilédones das sementes de *P. vulgaris* atuam como tecido de reserva e a presença dos extratos de *B. forficata* gera uma desordem metabólica nesse tecido, devido às alterações observadas na atividade do sistema antioxidante já nas primeiras horas de embebição (Tabela 2). Segundo Lara-Nuñez et al. (2009) essa desordem, pode refletir na velocidade de mobilização das reservas para o eixo embrionário, resultando em um atraso do tempo médio e índice de velocidade de germinação (Figura 1), assim como os resultados obtidos por Porto et al. (2018, dados não publicados), em que as proporções do extrato de *B. forficata* atrasaram a degradação de açúcares solúveis totais, também comprometendo a distribuição temporal da germinação. Esta desordem também foi observada em neste trabalho.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO EIXO EMBRIONÁRIO

Na avaliação da atividade específica da SOD para o eixo embrionário das sementes de *P. vulgaris*, verificamos que de modo geral, a atividade desta enzima é elevada com 24 horas de embebição. A presença do extrato na proporção de 5 % promoveu um aumento na atividade da SOD com 9 horas de embebição. Na análise do desdobramento dentro das horas de embebição, observamos que, com 3 horas o extrato das folhas de *B. forficata* na proporção de 2,5 % aumenta a atividade da SOD. Com 9 e 12 horas o aumento é observado na proporção de 5 %, enquanto que com 24 horas de embebição, este mesmo comportamento é observado com o extrato nas proporções de 2,5 e 7,5 % (Tabela 2).

Erly C. Porto, Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz, Guilherme de Almeida Garcia Rodrigues, Maiara Iadwizak Ribeiro, Jaqueline Malagutti Corsato e Andrea Maria Teixeira Fortes

Tabela 2: Atividade enzimática das enzimas Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Peroxidase (POD) do eixo embrionário das sementes de *P. vulgaris* L. em 3, 6, 9, 12 e 24 horas de embebição, submetidas a diferentes proporções de extrato aquoso de *B. forficata* L.

Tratamentos	SOD (U/mg de proteína)				
	3h	6h	9h	12h	24h
0 %	1,46 bB	0,86 aB	1,10 bB	1,74 bA	2,26 bA
2,5 %	2,03 aB	1,09 aC	1,32 bC	1,91 bB	3,10 aA
5 %	1,04 bC	1,02 aC	2,92 aA	2,95 aA	2,31 bB
7,5 %	1,17 bC	1,12 aC	0,93 bC	2,00 bB	3,23 aA
10 %	1,35 bB	0,55 aC	0,82 bC	2,73 aA	2,61 bA
CV(%)	24,44				
Tratamentos	CAT (H ₂ O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína)				
	3h	6h	9h	12h	24h
0 %	1,34 aB	1,14 aB	0,98 aB	1,90 bA	1,44 cB
2,5 %	0,87 bB	1,02 aB	0,72 bB	0,90 dB	1,95 bA
5 %	0,73 bB	1,11 aB	1,00 aB	2,94 aA	1,02 cB
7,5 %	1,45 aA	0,73 aB	0,51 bB	1,48 cA	1,92 bA
10 %	0,43 bC	0,71 aC	1,44 aB	1,35 cB	3,31 aA
CV(%)	26,27				
Tratamentos	POD (μmol de purpurogalina min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína)				
	3h	6h	9h	12h	24h
0 %	0,08 aA	0,03 aB	0,03 bB	0,06 aA	0,09 bA
2,5 %	0,09 aB	0,04 aC	0,05 bC	0,06 aC	0,12 aA
5 %	0,05 bB	0,05 aB	0,08 aA	0,07 aA	0,06 cB
7,5 %	0,04 bC	0,04 aC	0,05 bC	0,08 aB	0,12 aA
10 %	0,06 bB	0,03 aC	0,05 bB	0,07 aB	0,10 bA
CV(%)	25,33				

*Médias dos tratamentos seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0.05$). C.V: coeficiente de variação.

A atividade da catalase no eixo embrionário foi significativa entre os fatores estudados. O eixo embrionário submetido às proporções 2,5 e 10 % apresentaram as maiores atividades da catalase apenas com 24 horas de embebição (Tabela 2). Já na presença da proporção 5 % a atividade dessa enzima foi elevada com 12 horas e na proporção 7,5% com 3, 12 e 24 horas de embebição (Tabela 2). Dentro do intervalo de horas de embebição, observamos que com 3 horas os extratos na proporção 2,5; 5 e 10,% reduziram a atividade da CAT, e com 9 horas de embebição essa mesma redução ocorreu com os extratos 2,5 e 7,5 % (Tabela 2). Com 12 e 24 horas a presença do extrato aquoso na proporção de 5 e 10 %, respectivamente, aumentaram a atividade da CAT (Tabela 2).

Para a peroxidase, observamos que, no eixo embrionário os extratos de *B. forficata* na proporção 2,5, 7,5 e 10 % aumentam a atividade dessa enzima com 24 horas de embebição, enquanto o extrato na proporção de 5 % esse aumento é verificado com 9 e 12 horas (Tabela 2). Com a análise das horas de embebição, verificamos que, com 3 horas a atividade da POD é reduzida a partir da proporção 5 % de extrato, enquanto que com 9 horas, a atividade dessa enzima aumenta na presença do extrato a 5 % e com 24 horas o aumento é observado com os extratos na proporção de 2,5 e 7,5 %.

Os resultados da atividade enzimática do embrião evidenciam que ocorreu uma maior atividade das enzimas, de maneira geral, no período de 9 a 24 horas de embebição, quando tratados

Resposta do sistema antioxidante e fisiologia da germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. sob ação de extrato aquoso de *Bauhinia forficata* Link.

Erly C. Porto, Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz, Guilherme de Almeida Garcia Rodrigues, Maiara Iadwizak Ribeiro, Jaqueline Malagutti Corsato e Andrea Maria Teixeira Fortes com os extratos de *B. forficata* L.. Possivelmente, uma alta atividade verificada nesse intervalo de horas, pode ser devido ao aumento na absorção de água pelo eixo embrionário dessas sementes, como foi observado no trabalho de Silva et al. (2014), em que o eixo embrionário aumenta 100 g / kg de água, no intervalo de 6 para 9 horas de embebição.

As atividades enzimáticas que atuam na desintoxicação de EROS foi elevada ao final do processo germinativo evidenciando uma tentativa de minimizar os danos causados pela presença dos extratos. Resultados do estudo de Ribeiro et al. (2017), também identificaram em sementes de *Cucumis sativus* submetidas a extratos de *Leucaena leucocephala*, alta atividade da catalase com 24 horas de embebição, porém nos tratamentos de menor proporção de extrato. Entretanto, os autores não observaram redução na porcentagem de germinação, e sim aumento do tempo médio de germinação e baixo índice de velocidade de germinação, assim como nos nossos resultados.

Observamos que a atividade da POD foi alta com 24 horas de embebição, para todos os tratamentos testados, exceto o 5 %. A atividade da peroxidase, gera o radical hidroxila, que vai ser responsável pela quebra das ligações covalentes entre os polissacarídeos de parede celular (Schopfer 2001). Tal evento pode estar relacionado com o direcionamento do metabolismo para o alongamento celular (Quiroga et al. 2000).

Ao quantificar as atividades enzimáticas para o eixo embrionário tratado com os extratos de *B. forficata* L., verificamos que houve uma elevação da atividade ao final do processo, possivelmente devido ao processo de alongamento celular, com destaque para a atuação das enzimas SOD e POD (Tabela 2).

Dessa forma, concluímos que a alteração da atividade da POD no eixo embrionário de *P. vulgaris* tratados com os extratos de *B. forficata* L., serve como um indicativo da protrusão da raiz primária na germinação, visto que a baixa quantidade de H₂O₂ permite o afrouxamento da parede celular em eudicotiledôneas (Passardi et al. 2005).

Ao verificarmos em conjunto o padrão de atividade enzimática na presença dos extratos de *B. forficata* L., nas sementes de feijão (cotilédone e eixo embrionário) observamos que, na fase inicial do processo germinativo ocorre um maior dano de membrana e conseqüentemente uma elevada atividade das enzimas avaliadas. Possivelmente tal evento esteja associado ao fato de estar ocorrendo no tecido de reserva a mobilização das reservas energéticas necessárias durante a germinação.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo apontam que, possivelmente o extrato aquoso de *B. forficata* apresenta atividade alelopática, visto que o índice de efeito alelopático foi negativo como também retardando a velocidade da germinação nas sementes de feijão. Tal efeito, pode ser explicado pelo estresse oxidativo gerado pela presença do extrato, onde foi observado um aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante nas sementes de feijão tratados com as maiores proporções (7,5 e 10 %) do extrato de *B. forficata*.

REFERÊNCIAS

- Almeida GD, Zucoloto M, Zetun MC, Coelho I, Sobreir FM 2008. Oxidative stress in vegetable cells mediated by allelochemicals. *Rev Fac Nac de Agro Medellín* 61(1):4237-4247.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp Bot* 53:1331–1341.
- Apel K, Hirt H 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev of Plant Biol* 55:373–399.
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol Plant.* 104:280-292.
- Barborsa MR, Sailva MMA, Willadino L, Ulisses C, Camara TR 2014. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural* 44(3):453-460.
- Brasil 2009. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa, 399 pp.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Beauchamp C, Fridovich I 1971. Superoxide dismutase improved as says and as say applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276-287.
- Bohm PAF, Zanardo FML, Ferrarese MLL, Ferrarese OF 2006. Peroxidase activity and lignification in soybean root growth-inhibition by juglone. *Biol plant* 50(2):315-317.
- Bewley JD, Bradford K, Hilhorst H, Nonogaki H 2013. *Seeds Physiology of development and germination* vol. III. Springer-Verlag, New York, 392 pp.
- Blanco JA 2007. The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models. *Ecolo model.* 109:65-67.
- Carpanezzi AA, Carpanezzi OTB 2006. *Espécies Nativas Recomendadas para Recuperação Ambiental no Estado do Paraná, em Solos Não Degradados*. Vol. I Colombo: Embrapa Florestas, 57 pp.
- Carvalho WP, Carvalho GJ, Neto DDOA, Teixeira LGV 2014. Allelopathy of green manures extracts on germination and initial growth of the lettuce. *Biosc J*, 30(3):1-11.

Resposta do sistema antioxidante e fisiologia da germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. sob ação de extrato aquoso de *Bauhinia forficata* Link.

- Erly C. Porto, Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz, Guilherme de Almeida Garcia Rodrigues, Maiara Iadwizak Ribeiro, Jaqueline Malagutti Corsato e Andrea Maria Teixeira Fortes Cheng, F. Cheng Z. 2015. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Front Plant Sci.* 6:1020.
- Cruz-Ortega R, Ayala-Cordero G, Anaya AL. 2002. Allelochemical stress produced by the aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: effects on roots of bean, maize, and tomato. *Physiol Plant* 116:20–27.
- Cruz-Ortega R, Lara-Núñez A, Anaya AL 2007. Allelochemical stress can trigger oxidative damage in receptor plants. *Plant Sign Behavior* 2(4):269-270.
- Daneluzzi GS, Dos Santos VHM, Silva LP, Da Silva RMG 2014. Evaluation of phytotoxic and cytotoxic potential of *Pyrostegia venusta* (Ker-gawl.) Miers (bignoniaceae). *Biosc J* 30(4):1231-1240.
- Edmond JB, Drapala WJ 1958. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. *Proce American Soc Horti Sci* 71:428-434.
- Ferreira A, Aquila MA 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Rev. Bras. de Fisiol. Vegetal* 12:175-204.
- Gniazdowska A, Krasuska U, Andrzejczak O, Soltys D 2015. Allelopathic Compounds as Oxidative Stress Agents: Yes or NO. In Gupta JK, Igamberdiev AU, *Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants, Signaling and Communication in Plants*. Springer international Publishing, Switzerland, p.155–176.
- Gniazdowska A, Bogatek R 2005. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. *Acta Physiol Plant* 27(3):395–407.
- Gao X, Li MEI, Gao Z, Li C, Sun Z 2009. Allelopathic effects of *Hemistepta lyrata* on the germination and growth of wheat, sorghum, cucumber, rape, and radish seeds. *Weed Biol Manag* 9(3):243-249.
- Harper JR, Balke NE 1981. Characterization of the inhibition of K⁺ absorption in oat roots by salicylic acid. *Plant Physiol.* 68:1349–1353.
- Labouriau LG 1983. *A germinação de sementes*. Organização dos Estados Americanos, Washington, 174 pp.
- Lorenzi H 2002. *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Vol II, 4 ed. Nova Odessa, São Paulo, 384 pp.
- Manoel DD, Doiche CFR, Ferrari TB, Ferreira G 2009. Atividade alelopática dos extratos fresco e seco de folhas de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) e pata-de vaca (*Bauhinia forficata* link) sobre a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de tomate. *Sem Ciênc Agrs* 30(1):63-70.
- Maraschin-Silva F, AQUILA MEA 2006. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. *Rev Árvore* 30(4):547-555.
- Meira RO 2016. *Alelopátia entre espécies de diferentes categorias sucessionais utilizadas na restauração ecológica*, Master Thesis, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 96 pp.
- Paula CS, Canteli VCD, Silva CB, Miguel OG, Miguel MD 2015. Potencial fitotóxico com enfoque alelopático de *Bauhinia unguolata* L. sobre sementes e plântulas de alface e cebola. *Rev Ciênc Farm Básica e Apli* 36(3):445-452.
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C, 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep* 24: 255–265.
- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, Milrad FS, Tigier H, Valpuesta V 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* 122:1119–1128.

Resposta do sistema antioxidante e fisiologia da germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. sob ação de extrato aquoso de *Bauhinia forficata* Link.

Erly C. Porto, Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz, Guilherme de Almeida Garcia Rodrigues, Maiara Iadwizak Ribeiro, Jaqueline Malagutti Corsato e Andrea Maria Teixeira Fortes Reigosa MJ, Sánchez-Moreiras A, González L 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. *Crit. Rev. Plant Sci* 18(5):577-608.

Rezende CP, Pinto JC, Evangelista AR, Santos IPA 2003. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens. *Boletim Agrop* 54:1-55.

Resende LA, Pinto LVA, Santos EC, Silva S 2015. Crescimento e sobrevivência de espécies arbóreas em diferentes modelos de plantio na recuperação de área degradada por disposição de resíduos sólidos urbanos. *Rev Arvore* 39(1):147-157.

Rice EL, 1984. *Allelopathy*, vol.II, Academic Press, Orlando, 353pp.

Ribeiro VM, Spiassi A, Marcon TR, Lima GP, Corsato JM, Fortes AMT 2017. Antioxidative enzymes of *Cucumis sativus* seeds are modulated by *Leucaena leucocephala* extracts. *Acta Scientiarum* 39:373-380.

Rizzardi MA, Neves R, Lamb TD, Johann LB 2008. Potencial alelopático da cultura da canola (*Brassica napus* L. var. oleifera) na supressão de picão-preto (*Bidens* sp.) e soja. *Rev Bra Agroc* 14(2):239-248.

Silva JB, Nakagawa J 1995. Estudos de fórmulas para cálculo de velocidade de germinação. *Informativo Abrates* 5:62-73.

Schopfer P, Plachy C, Frahy G 2001. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide & hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol* 125:1591-1602.

Souza filho APS, RODRIGUES LRA, Rodrigues TJD 1996. Efeitos de extratos aquosos de assa-peixe sobre a germinação de três espécies de braquiária. *Plant Daninha* 14(2):93-101.

Teisseire H, Guy V 2000. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Science* 153:65-72.

Viçosi KA, Ferreira AAS, Oliveira LAB, Rodrigues F 2017. Estresse hídrico simulado em genótipos de feijão, milho e soja. *Rev Agri Neot* 4(1):36-42.

Villela FA, Doni filho L, Sequeira EL 1991. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. *Pes Agropec Bras* 26:1957-1968.

Wardle DA, Ahmed M, Nicholson KS 1991. Allelopathic influence of nodding thistle (*Carduus nutans* L.) seeds on germination and radicle growth of pasture plants. *J Agric Res* 34(2):185-191.

Response Of The Antioxidant System And Physiology Of Seed Germination Of *Phaseolus Vulgaris* L. Under The Action Of Aqueous Extract Of *Bauhinia Forficata* Link.

ABSTRACT

The aim of the present work was evaluated in the effect of different proportions of aqueous extract of *Bauhinia forficata* L. on the physiological germination process and an enzymatic activity of bean seeds without germination solution. The treatments were composed of (water) proportions; 2.5; 5; 7.5 and 10% (dried leaves of *B. forficata*). There is a germination, rate of germination, mean germination time, allelopathic index (RI), enzyme activity superoxide dismutase, catalase and peroxidase. The velocity

Resposta do sistema antioxidante e fisiologia da germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. sob ação de extrato aquoso de *Bauhinia forficata* Link.

Erly C. Porto, Ezequiel Marçal Zanchetti da Luz, Guilherme de Almeida Garcia Rodrigues, Maiara Iadwizak Ribeiro, Jaqueline Malagutti Corsato e Andrea Maria Teixeira Fortes
index and the mean germination time as well as the allelopathic index were negatively affected as the extract ratios tested increased. There was high activity of the enzymes at the beginning of the seed imbibition between 3 and 6 hours for cotyledon activity and high, and no germination at the end of the germination process, between 12 and 24 hours of imbibition. The increase of the extract proportions of the leaves of *B. forficata* affected the enzymatic activities in the germination process of the bean seeds resulting in a delay of the germination.

Keywords: allelopathy, antioxidant enzymes, germination

Submissão: 26/06/2018

Aceite: 03/09/2020