

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

DOUGLAS JUNIOR BERTONCELLI

**ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE ESPÉCIES DE TREVO SOBRE
SEMENTES DE MILHO, MILHÃ E PICÃO PRETO**

DISSERTAÇÃO

**PATO BRANCO
2015**

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

DOUGLAS JUNIOR BERTONCELLI

**ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE ESPÉCIES DE TREVO SOBRE
SEMENTES DE MILHO, MILHÃ E PICÃO PRETO**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2015

DOUGLAS JUNIOR BERTONCELLI

**ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE ESPÉCIES DE TREVO SOBRE
SEMENTES DE MILHO, MILHÃ E PICÃO PRETO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Miguel
Mazaro

Co-Orientador: Prof. Dr. Pedro Valério
Dutra de Moraes

PATO BRANCO

2015

B547a

Bertoncelli, Douglas Junior.

Atividade alopática de espécies de trevo sobre sementes de milho, milha e picão preto / Douglas Junior Bertoncelli. -- 2015.

109 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Miguel Mezaro

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Valério Dutra de Moraes

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2015.

Inclui bibliografias

1. Isoflavonóides. 2. Metabólitos secundários. 3. *Trifolium* sp. 4. *Zea mays*. 5. *Digitaria* sp. I. Mezaro, Sergio Miguel, orient. II. Moraes, Pedro Valério Dutra de, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD (22. ed.) 630

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n.º 104

Atividade Alelopática de Espécies de Trevo Sobre Sementes de Milho, Milhã e Picão Preto

por

Douglas Junior Bertoncelli

Dissertação apresentada às nove horas do dia onze de fevereiro de dois mil e quinze, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro
UTFPR/DV
Orientador

Prof. Dr. Luchele Furlan Sirtoli
UNISEP – Dois Vizinhos

Prof. Dr. Jean Carlo Possenti
UTFPR/DV

Prof. Dr. Pedro Valério Dutra de Moraes
UTFPR/DV

Visto da Coordenação:

Prof. Dr. Giovani Benin
Coordenador do PPGAG

* “O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGAG.”

Dedico esse trabalho à Deus, minha família, amigos, colegas de trabalho e orientadores pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade.

AGRADECIMENTOS

Certamente estes parágrafos a seguir não irão atender a todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase de minha vida. Portanto, desde já peço desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas elas podem estar certas que fazem parte do meu pensamento e de minha gratidão.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e iluminar minha caminhada.

Agradeço também a minha família pelo apoio, pois acredito que sem eles seria muito difícil vencer esse desafio.

Agradeço aos Professores, Dr. Sergio Miguel Mazaro, Dr. Pedro Valério Dutra de Moraes e Dr. Jean Carlo Possenti, pela dedicação, paciência, desafios propostos e pela orientação; por meio deles, eu me reporto a toda a comunidade da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) Câmpus Pato Branco e Câmpus Dois Vizinhos pelo apoio.

A todos os colegas de trabalho do laboratório de Análises de sementes e do laboratório de fitopatologia gostaria de externar minha satisfação de poder conviver com eles durante a realização do meu mestrado.

Agradeço também aos professores e alunos de química que me ajudaram no desenvolvimento do meu trabalho.

Gostaria de agradecer também a todos os meus amigos, em especial Kelly Pazolini, Driéli Aparecida Reiner, Rita de Cacia Serrão, Fabiana Bertinato, Indianara Muller, Nean Dalacosta, Adriano Lewandowski e Edenes Loss, pelas risadas, companhia, brincadeiras, caronas e por serem muito especiais.

Agradeço também a todos que me ajudaram no desenvolvimento dos trabalhos.

Agradeço a Capes pelo suporte financeiro através da bolsa de mestrado.

É preciso que o discípulo da sabedoria tenha o coração grande e corajoso. O fardo é pesado e a viagem longa.

Confúcio

RESUMO

BERTONCELLI, Douglas Junior. Atividade alelopática de espécies de trevo sobre sementes de milho, milhã e picão preto. 109 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

As plantas de cobertura além de melhorarem as características do solo também podem apresentar efeito alelopático tanto sobre plantas daninhas como sobre a cultura sucessora, nesse sentido é importante conhecer as interações que ocorrem entre as plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial alelopático de trevos em diferentes concentrações de extratos obtidos de diferentes formas, sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de sementes e plântulas de milho, milhã e picão preto. Avaliou-se em esquema fatorial 3 x 3 x 5, sendo os fatores extratos (infusão, maceração e alcoólico), as espécies de trevos (branco, vermelho e vesiculoso), e concentrações (2,5; 5,0; 7,5 e 10 %) sendo 0% a testemunha (água destilada). A unidade experimental foi constituída por 100 sementes dispostas em rolo de papel germiteste® para milho e picão preto e em gerbox para milhã, em quatro repetições, os quais foram umedecidos com os diferentes extratos e ou água destilada, de acordo com os tratamentos. O teste de germinação foi instalado em câmara de crescimento (BOD) com fotoperíodo de 12/12 h luz/escuro e temperatura de 25 ±1°C. As avaliações de germinação foram realizadas diariamente e no final do experimento com 10 dias, foi mensurado o índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento de raiz (CR), parte aérea (CPA), massa seca de raiz (MSR) e parte aérea (MSPA). Para as plântulas de milho foi determinado também os parâmetros bioquímicos dos teores de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL). Para amparar os resultados obtidos, foi realizado o espectro de infravermelho dos extratos. Observou-se que todos os extratos apresentaram efeito sobre as sementes de milho, milhã e picão preto, causando redução da germinação, IVG, CR, CPA, MSR, MSPA, e também houve alteração nos valores de AST e AR das plântulas de milho. As espécies de trevos branco, vermelho e vesiculoso nas diferentes formas de extração apresentam efeito alelopático em sementes e plântulas de milho, milhã e picão preto, com destaque para o extrato alcoólico. Analisando os espectros, foi possível observar a presença de compostos fenólicos em todos os extratos. Os efeitos alelopáticos verificados variaram, em função da forma de extração, bem como das concentrações.

Palavras-chave: Isoflavonóides, Metabólitos secundários, *Trifolium* sp., *Zea mays*, *Digitária* sp., *Bidens* sp..

ABSTRACT

BERTONCELLI, Douglas Junior. Allelopathic activity of clover species on corn seeds, and large crabgrass and prick. 109 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Federal University of Technology - Paraná. Pato Branco, 2015.

The Cover crops besides improving soil characteristics may also have allelopathic wont so much about the weeds on the successor culture, so it is important to establish the interactions that occur between plants. The objective of this study was to evaluate the allelopathic potential of shamrocks in different concentrations of extracts obtained in different ways, on germination, early development of seeds and seedlings of corn, large crabgrass and pick. Was evaluated in a factorial 3 x 3 x 5, the extracts obtained by infusion, maceration and alcoholic species of white clover, red clover and vesiculosum clover at four concentrations (2.5, 5.0, 7.5 and 10 %) and control (distilled water), respectively. 100 seed scroll germitest corn and prick and 100 seeds per seedling for large crabgrass were sown, being the experimental unit in four replicates, which were moistened with different extracts or distilled water, according to the treatments. The germination test was carried out in a growth chamber (BOD) with a photoperiod of 12/12 h light / dark and temperature of 25 ± 1°C. Germination evaluations were performed daily, and at the end of the experiment 10 days, measured the germination speed index (GSI) and root length (RL) and shoot (LS) , root dry weight (RDW) and (SDW) , and for maize seedlings was also determined the levels of total soluble sugars (TSS) reducing sugars (RS), the enzyme phenylalanine ammonia-lyase activity (PAL). To support the results obtained, the infrared spectrum of the extracts was also performed. It was observed that all the extracts showed effect on maize seeds, and large crabgrass prick causing reduced germination, GSI, RL, LS, RDW, SDW, and there was also a change in TSS and RS in maize seedlings. The species of white, red and vesiculosum clovers in different forms of extraction have allelopathic effects on seeds and seedlings of corn, large crabgrass and prick, especially the alcoholic extract. Analyzing the spectra we could observe the presence of phenolic compounds in all extracts. The allelopathic effects seen varied, depending on the form of extraction and the merger.

Keywords: Isoflavones, Secondary Metabolites, *Trifolium* sp., *Zea mays*, *Digitária* sp., *Bidens* sp..

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Germinação (%) de sementes de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015..... 31
- Figura 2 - Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015 33
- Figura 3 – Comprimento (cm) de raiz de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015..... 35
- Figura 4 – Comprimento (cm) de parte aérea de plântulas de milho (*Zea mays*) submetidas à aplicação de diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.. 37
- Figura 5 - Massa seca (mg) de raiz de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015..... 38
- Figura 6 - Massa seca (mg) da parte aérea de plântulas de milho (*Zea mays*) submetidas à aplicação de diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.. 39
- Figura 7 – Teores de açúcares redutores de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015... 41
- Figura 8 – Teores de açúcares solúveis totais de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015 42
- Figura 9 – Teores de proteína de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015..... 44
- Figura 10 – Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015..... 45
- Figura 11 – Espectro infravermelho dos extratos de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015..... 46

Figura 12 – Germinação (%) de sementes de milhã (<i>Digitaria</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso) UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	62
Figura 13 – Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de milhã (<i>Digitaria</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso) UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	63
Figura 14 – Comprimento (cm) de raiz de plântulas de milhã (<i>Digitaria</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso) UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	65
Figura 15 – Comprimento (cm) de parte aérea de plântulas de milhã (<i>Digitaria</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso) UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	67
Figura 16 – Massa seca (mg) de raiz de plântulas de milhã (<i>Digitaria</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	69
Figura 17 – Massa seca (mg) da parte aérea de plântulas de milhã (<i>Digitaria</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso) UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	70
Figura 18 – Espectro infravermelho dos extratos de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	71
Figura 19 – Germinação (%) de sementes de picão preto (<i>Bidens</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso), UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	84
Figura 20 – Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de picão preto (<i>Bidens</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso), UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	86
Figura 21 – Comprimento (cm) de raiz de plântulas de picão preto (<i>Bidens</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso), UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	87
Figura 22 – Comprimento (cm) de parte aérea de plântulas de picão preto (<i>Bidens</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso), UTFPR, Pato Branco,	

PR, 2015.....	89
Figura 23 – Massa seca (mg) de raiz de plântulas de picão preto (<i>Bidens</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso), UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	92
Figura 24 – Massa seca (mg) da parte aérea de plântulas de picão preto (<i>Bidens</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso), UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	92
Figura 25 – Espectro infravermelho dos extratos de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Germinação (%) de sementes de milho (<i>Zea mays</i>) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	30
Tabela 2 - Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de milho (<i>Zea mays</i>) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	33
Tabela 3 – Comprimento (cm) de raiz de plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015..	34
Tabela 4 – Comprimento (cm) de parte aérea de plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	36
Tabela 5 – Massa seca (mg) de raiz de plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015....	37
Tabela 6 – Massa seca (mg) da parte aérea de plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	39
Tabela 7 – Teores de açúcares redutores (mg/g de tecido vegetal) de plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	40
Tabela 8 – Teores de açúcares solúveis totais (mg/g de tecido vegetal) de plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	41
Tabela 9 – Teores de proteína (mg) de plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015..	43
Tabela 10 – Germinação (%) de sementes de milhã (<i>Digitaria</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015....	61
Tabela 11 – Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de milhã (<i>Digitaria</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	63
Tabela 12 – Comprimento (cm) de raiz de plântulas de milhã (<i>Digitaria</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	65
Tabela 13 – Comprimento (cm) de parte aérea de plântulas de milhã (<i>Digitaria</i> sp.)	

embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	66
Tabela 14 – Massa seca (mg) de raiz de plântulas de milhã (<i>Digitaria</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	68
Tabela 15 – Massa seca (mg) da parte aérea de plântulas de milhã (<i>Digitaria</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	69
Tabela 16 – Germinação (%) de sementes de picão preto (<i>Bidens</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	83
Tabela 17 – Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de picão preto (<i>Bidens</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	85
Tabela 18 – Comprimento (cm) de raiz de plântulas de picão preto (<i>Bidens</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	86
Tabela 19 – Comprimento (cm) de parte aérea de plântulas de picão preto (<i>Bidens</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	88
Tabela 20 – Massa seca (g) de raiz de plântulas de picão preto (<i>Bidens</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	90
Tabela 21 – Massa seca (g) da parte aérea de plântulas de picão preto (<i>Bidens</i> sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.....	91

LISTA DE SIGLAS

IVG	Índice de velocidade de germinação
CR	Comprimento de raiz
CPA	Comprimento da parte aérea
MSR	Massa seca de raiz
MSPA	Massa seca da parte aérea
AR	Açúcares redutores
AST	Açúcares solúveis totais
FAL	Fenilalanina amonia-liase
PR	Unidade da Federação – Paraná
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

LISTA DE ABREVIATURAS

mg	Miligramo
Kg	Quilogramo
h	Horas
ha	Hectare
ml	Mililitro
M	Molar
m	Metro
mm	Milimetro

LISTA DE ACRÔNIMOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celcius
”	Segundos
o	Graus
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	18
REFERÊNCIAS.....	21
2 CAPÍTULO I - Espécies de trevo e seu potencial alelopático sobre sementes de milho	23
2.1 RESUMO.....	23
Palavras-chave.....	23
2.2 ABSTRACT:.....	24
Keywords.....	24
2.3 INTRODUÇÃO.....	24
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
2.6 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS.....	49
3 CAPÍTULO II - Alelopatia de espécies de trevos sobre sementes de <i>Digitaria sp.</i>	55
3.1 RESUMO.....	55
Palavras-chave.....	56
3.2 ABSTRACT:.....	56
Keywords.....	56
3.3 INTRODUÇÃO.....	57
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.6 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	74
4 CAPÍTULO III - Atividade alelopática de espécies de trevos sobre sementes de <i>Bidens sp.</i>	77
4.1 RESUMO.....	77
Palavras-chave.....	77
4.2 ABSTRACT:.....	78
Keywords.....	78
4.3 INTRODUÇÃO.....	78
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	80
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
4.6 CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS.....	96
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
Apêndices.....	101

1 INTRODUÇÃO GERAL

Uma das principais espécies utilizadas na agricultura brasileira é o milho (*Zea mays*), com uma área plantada no Brasil na safra 2012/2013 de cerca de 15 milhões de hectares, com uma produção próxima a 78 milhões de toneladas, com rendimento em torno de $5,0 \text{ t ha}^{-1}$ (CONAB, 2013). Neste mesmo período, o Paraná teve uma produção de mais de 18 milhões de toneladas, com uma área plantada em torno de 3 milhões de hectares, e produtividade de aproximadamente $6,0 \text{ T ha}^{-1}$ (CONAB, 2013).

Porém esta produtividade é considerada baixa para a cultura, devido a inúmeros fatores, entre os quais certamente a interferência exercida pela presença de plantas daninhas assume grande importância (KOZLOWSKI, 2002). Dentre as principais plantas daninhas que causam danos a cultura do milho, podemos destacar o milhã (*Digitaria* sp.) e picão preto-preto (*Bidens* sp.).

A milhã (*Digitaria* sp.) é altamente agressiva como infestante, sendo relatado como problema em 60 países, infestando mais de 30 culturas de importância econômica. Essa espécie é particularmente hábil no processo de competição, causando danos em culturas anuais e em viveiros, apresentando vantagem em relação às culturas em condição de seca, além de apresentarem efeitos alelopáticos sobre várias plantas cultivadas (DIAS et al., 2007).

O picão preto (*Bidens* sp.) é uma planta originária da América Latina, largamente dispersa em várias regiões do mundo, ocorrendo em maior intensidade na América do Sul, sendo que no Brasil, é encontrada em praticamente todo o território, com maior proporção nas áreas agrícolas da Região Centro-Sul, onde constitui uma das mais importantes plantas infestantes, tanto de culturas anuais como em perenes (KISSMANN; GROTH, 1992).

A interferência da planta daninha na cultura varia de acordo com a espécie, do grau de infestação, do tipo de solo, das condições climáticas reinantes no período, além do estágio fenológico da cultura (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000). O grau de interferência é frequentemente estimado com relação à produção da planta cultivada, podendo ser definido como o percentual de redução da produção econômica da cultura, gerada pela interferência da comunidade infestante (PITELLI, 1985).

Essa interferência pode ser pela competição por espaço, água, luz e/ou nutrientes, além da inibição química do desenvolvimento das plantas através de liberação de compostos oriundo do seu metabolismo, efeito este denominado de alelopatia (ALMEIDA, 1991).

As substâncias alelopáticas são produtos intermediários ou finais do metabolismo secundário das plantas, podendo ser liberadas ao ambiente por volatilização, lixiviação, exsudação radicular e/ou pela decomposição microbiana que resulta na liberação de compostos orgânicos, contidos nas células, alguns dos quais possuem propriedades alelopáticas (SANTOS et al., 2007).

No processo de liberação dos aleloquímicos por volatilização, após serem volatilizados das diferentes partes das plantas, podem ser absorvidos por plantas vizinhas, condensados no orvalho ou adsorvidos às partículas do solo (ALMEIDA, 1985). Já no processo de lixiviação, os aleloquímicos são removidos por ação da chuva, orvalho ou neblina, sendo que a quantidade de lixiviados depende da espécie, constituição e idade do tecido vegetal, entre outros fatores (ALMEIDA, 1985). A exsudação radicular pode ser outro processo de liberação de substâncias alelopáticas, podendo influenciar direta ou indiretamente na ação de microorganismos e nas interações entre as plantas (MORAES et al., 2012).

Contudo o principal processo de liberação de substâncias alelopáticas pode ser considerado a decomposição de resíduos vegetais. Na qual ocorre a perda da integridade da membrana celular ocasionando a liberação dos compostos que impõem toxicidade aos organismos vizinhos (MARASCHIN-SILVA; ÁQUILA, 2006).

A concentração das substâncias alelopáticas nas diferentes partes das plantas é desuniforme, tanto na qualidade, quantidade, espaço e no tempo, podendo serem encontrados em folhas, sementes, colmos, caules, cascas de troncos e de raízes, frutos, pólen, flores, rizomas, vagens e raízes de diferentes espécies de plantas, havendo variações em função de aspectos relacionados ao estágio de desenvolvimento e das próprias necessidades da planta (SOUZA FILHO, 2011).

A localização dos aleloquímicos nas plantas está relacionada a facilidade de liberação para o ambiente e função que podem desempenhar nas plantas, o que pode tornar seus efeitos mais imediatos e de maior magnitude (SOUZA FILHO, 2011).

Dentre as várias espécies de plantas que apresentam substâncias aleloquímicas, a família fabacea, representada pelos trevos, tem despertado interesse por apresentarem várias substâncias químicas pertencentes à classe dos flavanóides, os quais apresentam expressiva atividade biológica. Outra vantagem da utilização dos trevos está relacionada à melhoria da fertilidade do solo através da fixação biológica de nitrogênio (ABREU et al., 2005; LIEBMAN; SUNDBERG, 2006).

Assim, estudos que visem selecionar espécies cultivadas com potencial efeito alelopáticos permitirão delinear estratégias buscando uma maior sustentabilidade dos sistemas de produção agrícolas, além de possibilitar descobertas de novas moléculas químicas com potencial na formulação de novos agroquímicos que proporcionem melhores produtividades das lavouras.

O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial alelopático de trevos em diferentes concentrações de extratos e obtidos de diferentes formas, sobre a germinação, o desenvolvimento inicial de sementes e alterações bioquímicas nas plântulas de milho, milho e picão preto.

REFERÊNCIAS

ABREU, Gabriel. T.de; SCHUCH, Luis. O.B.; MAIA, Manoel. de.S.; ROSENTHAL, Mariane. D.; BACCHI, Sidnei.; PEREIRA, Edimo.; CANTARELLI, Leandro. D. Produção de biomassa em consórcio de aveia branca (*Avena sativa* L.) e leguminosas forrageiras. **Revista Brasileira de Agrociências**, v.11, n.1, p.19-24, 2005.

ALMEIDA, F.S. **Controle de plantas daninhas no plantio direto**. Londrina: IAPAR, 1991. 34p. (IAPAR, Circular 67).

ALMEIDA, F.S. **Influência da cobertura morta na biologia do solo**. A Granja, v.4, n.451, p.52-67, 1985.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Safras 2012/13. Milho total: comparativo da área, produção e produtividade. Disponível em:<[hptt://www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acessado em: 23/junho./2013.

Dias, A.C.R; Carvalho, S.J.P; Nicolai, M; Christoffoleti, P.J. Problemática da ocorrência de diferentes espécies de capim-colchão (*Digitaria* spp.) na cultura da cana-de-açúcar. **Planta Daninha**. Viçosa. vol.25, n.3, 2007.

FANCELLI, L. A.; DOURADO NETO, D. Manejo de plantas daninhas. In: FANCELLI, L.A.; DOURADO NETO, D. (Eds.). Produção de milho. Guaíba: **Agropecuária**, 2000. p. 183-215.

KISSMANN, C. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira, p.798, 1992.

KOZLOWSKI, Luiz. A. Período Crítico de Interferência das Plantas Daninhas na Cultura do Milho Baseado na Fenologia da Cultura. **Planta Daninha**, n.3, p.365-372, 2002.

LIEBMAN, Matt; SUNDBERG, David. N. Seed mass affects the susceptibility of weed and crop species to phytotoxins extracted from red clover shoots. **Weed Science**, v.54, n.2, p.340-345, 2006.

MARASCHIN-SILVA, Fabiana.; AQUILA, Maria. E.A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.1, p.61-69, 2006.

MORAES, Pedro. V.D; PANOZZO, Luis. E; VIGNOLO, Gerson. K; SANTOS, Leo. S. dos; BRANDOLT, Randal. R. Efeito alelopático de trevo-vesiculoso no crescimento inicial de milho e plantas daninhas. **Revista Agrarian** , v.5, n.16, p.99-105, 2012.

PITELLI, R. A. Interferências de plantas daninhas em culturas agrícolas. **Informe Agropecuário**, v.11, n.129, p.16-27, 1985.

SANTOS, Léo S. dos; MORAES, Pedro. V.D.de; AGOSTINETTO, Dirceu. PANOZZO, Luis. E; BRANDOLT, Randal. R; VIGNOLO, Gerson. K. **Potencial alelopático de trevo vesiculoso (*Trifolium vesiculosum* Savi.)**. XVI CIC (congresso de iniciação científica). Faculdade de agronomia Eliseu Maciel. 2007.

SOUZA FILHO, Antônio.P.S.I; TREZZI, Michelângelo.M.II; IOUE, M.H. Sementes como fonte alternativa de substâncias químicas com atividade alelopática. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 709-716, 2011.

2 CAPÍTULO I - ESPÉCIES DE TREVO E SEU POTENCIAL ALELOPÁTICO SOBRE SEMENTES DE MILHO

2.1 RESUMO

A utilização de coberturas vegetais melhora as características químicas, físicas e biológicas do solo, sendo cada vez mais estudado o potencial destas coberturas vegetais na supressão da germinação das sementes de plantas daninhas nas grandes culturas. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial alelopático de trevos em diferentes concentrações de extratos, obtidos de diferentes formas, sobre a germinação, o desenvolvimento inicial de sementes e alterações bioquímicas nas plântulas de milho. Avaliou-se os extratos obtidos por infusão, maceração e alcoólico das espécies de trevo branco, trevo vermelho e trevo vesiculoso, em quatro concentrações (2,5; 5,0; 7,5 e 10 %) e a testemunha (água destilada). Foram semeadas 100 sementes em cada rolo de papel germiteste, os quais foram umedecidos com os diferentes extratos e ou água destilada, de acordo com os tratamentos. As avaliações de germinação foram realizadas diariamente e no final do experimento com 10 dias, foi mensurado o índice de velocidade de germinação (IVG) e o comprimento de raiz (CR) e parte aérea (CPA), massa seca de raiz (MSR) e parte aérea (MSPA). Amostras vegetais das plântulas foram coletadas e quantificados os teores de açúcares redutores (AR), açúcares solúveis totais (AST), proteína e atividade da fenilalanina amonia-liase (FAL). Para amparar os resultados obtidos, também foi realizado o espectro de infravermelho dos extratos. Observou-se que todos os extratos apresentaram efeito sobre as sementes de milho, causando redução da germinação, IVG, CR, CPA, MSR, MSPA, AR, AST e proteínas. O extrato que causou maior efeito alelopático foi alcoólico de trevo branco. Analisando os espectros foi possível observar a presença de compostos fenólicos em todos os extratos. Os efeitos alelopáticos verificados variaram, em função da forma de extração, bem como das concentrações.

Palavras-chave: Leguminosas, Aleloquímicos, Metabólitos secundários, *Trifolium* sp., *Zea mays*.

2.2 ABSTRACT

The use of cover crops improves the chemical, physical and biological soil properties, and increasing the potential of these cover crops on the suppression of germination of weed seeds has been studied in great cultures. The objective of this study was to evaluate the allelopathic potential of clovers in different concentrations of extracts obtained in different ways, on germination, early development of seeds and biochemical changes in maize seedlings. We evaluated the extracts obtained by infusion, maceration and alcoholic species of white clover, red clover and vesiculosum clover at four concentrations (2.5 , 5.0, 7.5 and 10 %) and control (distilled water). 100 seeds were sown on each scroll germitest which have been moistened with various extracts or distilled water in accordance with the treatments. Germination evaluations were performed daily, and at the end of the experiment 10 days, measured the germination speed index (GSI) and root length (RL) and shoot (SL), root dry weight (RDW) and shoot (SDW). Vegetable seedling samples were collected and the levels of reducing sugars (RS), total soluble sugars (TSS), protein and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity. To support the results obtained, the infrared spectrum of the extracts was also performed. It was observed that all of the extracts showed effect on maize seed causing reduced germination, GSI, RL, SL, RDW, SDW, RS, TSS and proteins. The statement that caused greater allelopathic effect of white clover was alcoholic. Analyzing the spectra we could observe the presence of phenolic compounds in all extracts. The allelopathic effects seen varied, depending on the form of extraction and the merger.

Keywords: Legumes, Allelochemicals, Secondary Metabolites, *Trifolium* sp., *Zea mays*.

2.3 INTRODUÇÃO

Na região sul do Brasil, o sistema de semeadura mais utilizado pelos agricultores é a semeadura direta, onde a decomposição da palhada libera compostos aleloquímicos, podendo interferir tanto no desenvolvimento de plantas daninhas quanto das grandes culturas (TOKURA; NÓBREGA, 2005).

Os restos culturais das coberturas vegetais podem apresentar ação alelopática, influenciando a germinação e o desenvolvimento da cultura subsequente, por meio de substâncias químicas liberadas no ambiente, geralmente devido à decomposição do material vegetal, aonde ocorre perda da integridade da membrana celular, resultando na liberação direta de uma variedade de compostos no solo, capazes de influenciar o desenvolvimento dos microrganismos e das plantas que nele se encontram. O efeito alelopático pode ocorrer tanto durante o ciclo de cultivo quanto nos cultivos subsequentes (NÓBREGA et al., 2009).

Dentre as várias espécies de cobertura vegetal utilizadas no sistema de semeadura direta, as leguminosas tem se destacado cada vez mais, especialmente antecedendo a cultura do milho, pelo fato de possuírem a capacidade de fixar nitrogênio no solo (ARGENTA et al., 2001), melhorando assim as características químicas físicas e biológicas do solo.

Dentre as espécies leguminosas utilizadas como cobertura vegetal, os trevos, tem despertado interesse por apresentarem características agrônômicas desejáveis como, tolerância a geadas e a seca moderada, de fácil estabelecimento, apresentar ressemeadura natural e fixar nitrogênio atmosférico no solo. Além de sua grande diversidade de substâncias químicas, entre esses metabólitos, a classe dos flavanóides, os quais apresentam expressiva atividade biológica (TAIZ; ZEIGER, 2013) e ação alelopática (VERDI et al., 2005).

O termo alelopatia pode ser interpretado como um efeito que favorece ou desfavorece, direta ou indiretamente o desenvolvimento de uma planta sobre outra, através de produção de compostos químicos liberados no ambiente, sendo estes compostos conhecidos como aleloquímicos (SOUZA et al., 2006), que na sua maioria são oriundos do metabolismo secundário, principalmente compostos fenólicos, indo desde fenóis simples a taninos de estrutura complexa (MAZZAFERA, 2003).

Todavia a dificuldade em desenvolver experimentos controlados e isentos de influências químicas externas se torna um dos principais obstáculos no estudo da alelopatia. Isso limita o conhecimento a respeito do mecanismo pelo qual as

substâncias alelopáticas causam fitotoxicidade (WEIR et al., 2004). A interação com o ambiente pode favorecer ou desfavorecer o efeito alelopático de um determinado composto.

Na tentativa de reduzir as interferências sobre o possível composto aleloquímico, é comum no estudo da alelopatia a utilização de extratos vegetais a partir da planta em estudo, sendo que neste caso a “extração” é compreendida como retirada seletiva e completa de substâncias ou frações ativas da droga vegetal de interesse, para isso utiliza-se de solventes tecnologicamente apropriados e toxicologicamente seguros (MENDEZ et al., 2011).

É importante ressaltar que na escolha de um método de extração, primeiramente deve-se avaliar a eficiência e estabilidade da droga extraída, a disponibilidade e custo do processo escolhido, sendo que os processos mais comumente utilizados são a extração a frio aonde se destaca o processo de maceração e a extração a quente, aonde se destaca o processo de infusão (PETRY et al., 2001).

Os aleloquímicos podem agir diretamente sobre o metabolismo da planta alvo, afetando a estrutura celular, regulação hormonal, permeabilidade da membrana, absorção de nutrientes, fotossíntese, respiração, síntese de proteínas, atividade enzimática, dentre outras alterações (FERREIRA; ÁQUILA, 2000). De acordo com esses autores, devido ao fato de o metabolismo ser interligado, a alteração de um único mecanismo pode afetar rotas inteiras. Devido a essa complexidade a quantificação de sólidos solúveis, proteínas e fenilalanina amônia-liase, tornam se básicas, nos estudos iniciais de um possível aleloquímico.

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é uma das enzimas mais estudada no metabolismo secundário vegetal, pois está situada em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário e a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Trabalhando com extrato aquoso de trevo vesiculoso, Moraes et al. (2012), observaram que havia redução da germinação e alteração do desenvolvimento inicial de picão preto. Por sua vez, Tokura; Nóbrega (2005) observaram que os extratos das plantas de trigo, aveia preta, milheto, nabo forrageiro e colza apresentaram efeito alelopático em plântulas de milho. Spiassi et al. (2011), observaram que as coberturas vegetais de canola e cártamo apresentaram efeito

positivo sobre o crescimento inicial de plântulas de milho, já o crambe, nabo e aveia tiveram efeito negativo.

O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial alelopático de trevos em diferentes concentrações de extratos e obtidos de diferentes formas, sobre a germinação, desenvolvimento inicial de sementes e alterações bioquímicas nas plântulas de milho.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Dois Vizinhos, localizada na latitude de 25° 44" Sul e longitude de 53° 04" Oeste, com altitude de 565 metros.

Foram utilizados para a preparação dos extratos, espécies de trevo branco (*Trifolium repens* L.), trevo vermelho (*Trifolium pratensis* L.) e trevo vesiculoso (*Trifolium vesiculosum*) os quais foram cultivados em condições de campo, semeados em canteiros de 50m². A densidade de semeadura utilizada foi de 5 kg/ha de sementes. O solo local é do tipo Latossolo Vermelho Distroférico Típico com terreno apresentando a declividade média em torno de 10%. Antes da semeadura, realizou-se o controle mecânico das plantas daninhas, e então realizou-se a semeadura a lanço seguido de incorporação das sementes ao solo com o auxílio de um rastel. Não foram realizadas adubações, irrigações e aplicação de defensivos durante o cultivo. Após 70 dias da semeadura, durante o estágio vegetativo, foi realizada a coleta da parte aérea das plantas de trevo para o preparo dos extratos.

A matéria fresca coletada foi encaminhada para o laboratório de sementes da UTFPR, Campus Dois vizinhos, onde foi desidratada em estufa com circulação de ar forçada, com temperatura de 40°C, evitando dessa forma a perda de possíveis compostos alelopáticos voláteis. Após a desidratação o material foi triturado em moinho de facas para diminuir o tamanho das partículas e aumentar a área de contato do material vegetal e o solvente. Para tal, foi utilizado uma peneira em aço inox com malha de 20 mesh, o que equivale a uma granulometria de 0,840 mm.

Os extratos foram preparados no laboratório de fitossanidade da UTFPR, Campus Dois vizinhos. Os métodos de obtenção dos extratos seguiram os pressupostos da ANVISA (2014).

Para obtenção do extrato por maceração, utilizou-se 50 g de pó de trevo que foi misturado a 450 mL de água fria destilada. Após agitação manual, foi mantido em repouso na ausência de luz por um período de 24 horas, posteriormente foi realizada a filtração em papel filtro com porosidade de 3 micras, separando assim a parte sólida da solução.

Para o extrato obtido por infusão foi utilizado 450 mL de água destilada a qual foi previamente aquecida até a temperatura de 100 °C, em seguida adicionou-se 50 g de pó de trevo deixando-se em repouso por 20 minutos em recipiente fechado. Na sequência, foi realizada a filtração em papel filtro com porosidade de 3 micras.

Para o extrato alcoólico, utilizou-se 50 g de pó de trevo imersos em 450 mL de álcool etílico 92,8%, mantidos em repouso por 24 horas na ausência de luz, à temperatura de 25 °C. Após este período, foi feita a filtração em papel filtro (porosidade de 3 micras), medindo-se o volume total da solução obtido após a filtração. Na sequência, se removeu o etanol presente na solução por meio de evaporador rotativo. Posteriormente o resíduo da evaporação foi dissolvido em água destilada até completar o volume inicial da solução obtida após a filtração.

Após os extratos serem preparados na concentração de 10% peso/volume, estes foram diluídos em água destilada até a obtenção das concentrações de 2,5%; 5% e 7,5%.

Foram utilizados grãos comerciais de milho híbrido AG 8025 para aplicação dos extratos. O teste empregado seguiu as Regras Oficiais para Análises de Sementes (RAS) de milho (BRASIL, 2009). A germinação das sementes foi realizada em rolos de papel germitest sobre duas folhas de papel as quais foram umedecidas com os extratos ou água destilada, conforme os tratamentos. A quantidade de solução utilizada foi determinada multiplicando duas vezes e meia o peso do papel. Em cada rolo, foram dispostas 100 sementes de milho. O teste de germinação foi instalado em câmara de crescimento (BOD) com fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro e temperatura de 25 ±1°C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial (3x3x4+testemunha), constituído de: fator A - espécies de trevo (trevo branco, trevo vermelho e trevo vesículoso); fator B - formas de extrato (maceração, infusão e alcoólico); fator C - concentrações (2,5; 5; 7,5 e 10% peso/volume) dos extratos vegetais e testemunha com aplicação de água destilada.

Diariamente, durante 10 dias, foi realizada a contagem do número de sementes germinadas, para estabelecer o índice de velocidade de germinação (IVG), obtido através da fórmula descrita por Maguire (1962) e modificada por Wardle; Ahmed e Nicholson (1991): $VG=[N1/1+N2/2+N3/3+.....Nn/n]$, onde, N1, N2, N3 e Nn são o número de sementes germinadas e 1, 2, 3 e n são o número de dias após semeadura. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentaram parte aérea e radícula com comprimento mínimo de 1 cm.

Ao final do período (10 dias), foram avaliadas a germinação, o comprimento radicular (CR) e da parte aérea (CPA), após secagem em estufa (85°C), foi determinada a matéria seca do sistema radical (MSR) e matéria seca da parte aérea (MSPA), pela medida de 20 plântulas por unidade experimental.

Amostras de plântulas obtidas no teste de germinação foram utilizadas para determinação das análises bioquímicas. Para tais, foram coletadas amostras representativas das repetições de cada tratamento. As amostras foram imediatamente após a coleta, congeladas e armazenadas em freezer até as avaliações.

Para quantificação de proteínas totais, as amostras de tecido foram maceradas em almofariz com 3 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5). Em seguida, quantificado pelo método descrito por Bradford (1976). A determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL), foi por quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina, conforme metodologia descrita por Kuhn (2007).

Os teores de açúcares redutores (AR) foi determinado pelo método descrito por Miller (1959) e açúcares solúveis totais (AST) pelo método do fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), com soluções de glucose como padrões.

Para amparar os resultados obtidos, foi realizada uma avaliação dos compostos presentes nos extratos vegetais por meio de espectroscopia de infravermelho na central de análises da UTFPR, Campus Pato Branco. Uma amostra dos extratos vegetais (os mesmos utilizados nos testes de sementes) foi coletada e liofilizada para retirada da água presente nas amostras. Do pó obtido após a liofilização, foi utilizado 1 mg da amostra dos extratos e adicionado 100 mg de KBr (brometo de potássio), os quais foram macerados e posteriormente prensados para a formação da pastilha. Depois da pastilha estar formada, esta foi inserida no

espectrômetro de infravermelho e realizado a leitura. A região espectral utilizada foi de 250 a 4.000 cm^{-1} .

Os resultados obtidos foram tabulados e submetidos à análise de variância pelo teste F e, quando houve significância estatística, foi procedido comparação entre médias, para os fatores espécies de trevo e tipo de extrato, utilizando-se o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para o fator concentração dos extratos foi utilizada análise de regressão. Foi aplicado o teste de normalidade de Lilliefors, porém como os dados foram significativos, não houve necessidade de transformação dos dados. Foi utilizado o programa ASSISTAT para realização das análises estatísticas.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os fatores estudados houve interação para as variáveis, germinação, IVG, CR, CPA, MSR, MSPA, AR, AST e proteína.

O trevo branco foi à espécie que mais afetou a germinação das sementes de milho. Em relação à forma de extração, o extrato por infusão foi o que menos interferiu na germinação.

O extrato alcóolico de trevo branco foi o que apresentou as menores porcentagens de germinação (reduziu em 76,7%), seguido do extrato alcóolico de trevo vesiculoso (reduziu em 61,8%). Para o trevo vermelho, o extrato que mais interferiu na germinação das sementes de milho foi a maceração (Tabela 1).

Tabela 1. Germinação (%) de sementes de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculoso	
Testemunha	91 aA	91 aA	91 aA	91 a
Infusão	76 bB	82 bA	82 bA	80 b
Maceração	51 cB	53 cB	80 bA	61 c
Alcóolico	21 dC	78 bA	35 cB	45 d
Média	60 C	76 A	72 B	
CV	7,25			

Medias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Ao comparar a utilização dos extratos com a testemunha é possível observar que de maneira geral, a aplicação dos extratos nas suas diferentes concentrações reduziu a germinação das sementes de milho (Figura 1).

Para a extração por maceração do trevo branco (Figura 1A), o aumento da concentração favoreceu a germinação das sementes de milho até 2,5%, a partir da qual reduziu, chegando à zero na concentração de 7,5%. Resultado contrário foram observados por Gomes et al., (2013), aonde a aplicação de extrato aquoso de folhas frescas de tremço azul (*Lupinus angustifolius* L.) não apresentou interferência sobre o processo germinativo de sementes de milho.

O nível de inibição proporcionado por determinado composto aleloquímico varia de acordo com a sua concentração, sendo que em baixas concentrações as substâncias alelopáticas podem não ser inibitórias para determinada espécie ou até mesmo apresentar efeito estimulante, por outro lado quando está em alta concentração as substâncias são completamente inibitórias (SOUZA FILHO, 2002), fato que foi observado nos extratos alcoólicos de trevo branco e vesiculososo, e maceração de trevo branco (figura 1A e 1C),

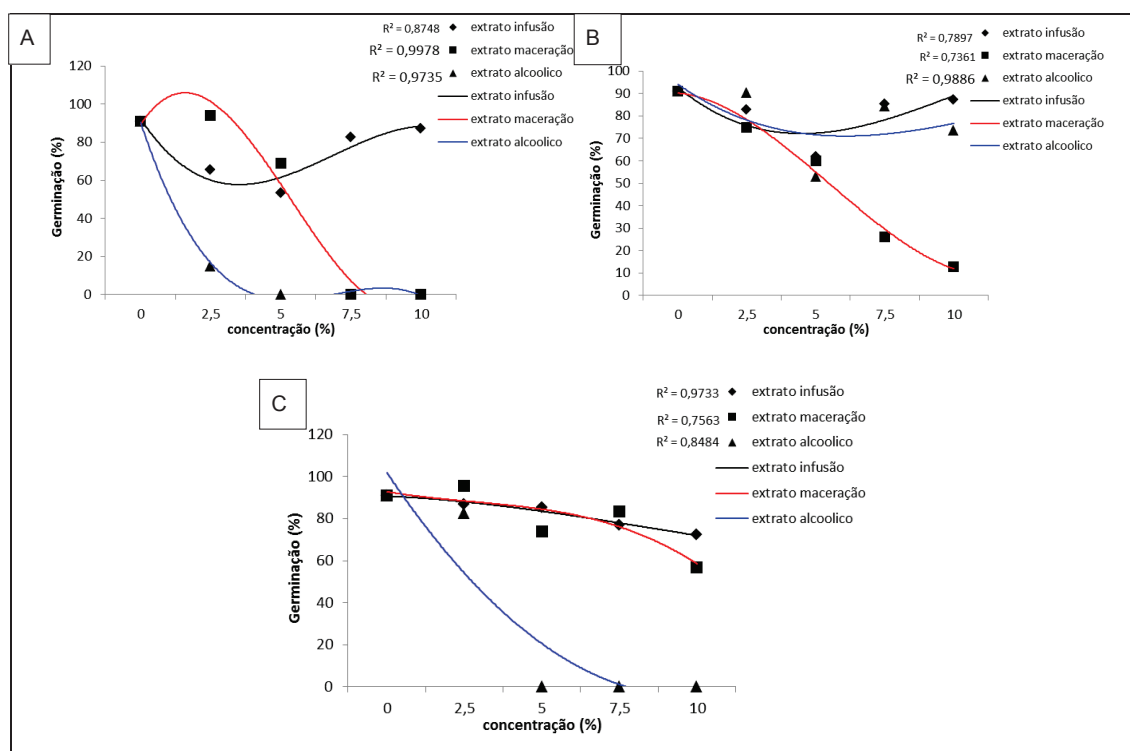


Figura 1. Germinação (%) de sementes de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculososo) UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Em relação à concentração dos extratos de trevo vermelho, pode-se observar que para as diferentes formas de extração (Figura 1B), o aumento da concentração resultou em diminuição da germinação das sementes, porém o extrato infusão e alcoólico não apresentaram grandes reduções na germinação nas maiores concentrações quando comparado ao extrato por maceração. Na concentração de 10% a porcentagem de germinação foi próxima aos valores obtidos da testemunha. Resultado semelhante foi encontrado por Santos et al. (2002), onde a aplicação de extrato de casca de café favoreceu a germinação das sementes de caruru nas maiores concentrações.

São comuns os efeitos onde concentrações baixas favorecem a germinação, intermediárias inibem e altas concentrações favorecem o potencial germinativo (Souza et al., 2005). Segundo Gatti et al., (2004) os efeitos dos compostos alelopáticos se relacionam aos processos fisiológicos da planta receptora e de maneira geral, agem como inibidores da germinação e do crescimento, entretanto a maior parte que são inibitórios em alguma concentração, são também estimulantes quando presentes em menores ou maiores concentrações. Ou seja, a ação das substâncias aleloquímicas não é muito específica, podendo uma mesma substância desempenhar várias funções, dependendo de sua concentração e composição química presente no tipo de extrato utilizado (CATTELAN et al., 2007).

Os resultados encontrados na germinação de sementes de milho são contrários à afirmação de Ferreira (2004). Segundo o autor, normalmente a porcentagem de germinação final é pouco afetada pela presença de compostos aleloquímicos, enquanto a velocidade média de germinação é mais sensível, resultando em alterações no padrão de germinação.

Essa modificação no processo de germinação na presença de extratos vegetais normalmente é devido à presença de compostos fenólicos que causam inibição da síntese de ácido giberélico e ou atividade da enzima α -amilase, ao quais afetam a germinação das sementes, por interferirem no sistema enzimático hidrolítico e de mobilização de reservas da semente (POLITYCKA; GMEREK, 2008).

Para o IVG, a extração alcoólica e a maceração resultaram em um maior atraso na germinação das sementes de milho, conseqüentemente com a redução mais expressiva do IVG. Em relação às espécies de trevo, o IVG apresentou os menores valores quando se utilizou extratos de trevo branco, com redução de 78,4% do IVG da cultura em comparação a testemunha (Tabela 2).

Resultados semelhantes foram verificados por Prates et al. (2001), em sementes de milho tratadas com extrato aquoso de *L. leucocephala* (leucena). Os autores observaram que os extratos dessa planta reduziram o IVG da espécie-teste.

Tabela 2. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			
	Branco	Vermelho	Vesiculososo	Média
Testemunha	18,62 aA	18,62 aA	18,62 aA	18,62 a
Infusão	14,85 bC	16,44 bB	19,87 aA	14,05 b
Maceração	7,61 cB	7,68 dB	10,76 bA	8,69 c
Alcólico	4,02 dC	10,86 cA	6,36 cB	7,09 d
Média	11,27 C	13,40 B	13,95 A	
CV	8,42			

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Para os extratos alcólico e maceração a elevação da concentração resultou na diminuição do IVG (Figura 2). Já para o extrato por infusão de trevo branco e vermelho a concentração intermediária foi mais expressiva na redução do IVG. Por outro lado, para o trevo vesiculososo ocorreu o inverso, a concentração intermediária do extrato por infusão aumentou o IVG, sendo estes valores maiores que a testemunha. Segundo Santos et al., (2002), substâncias consideradas inibitórias, possuem efeito estimulante sob baixas concentrações, com os inibidores parecendo agir sobre a atividade enzimática e ou atividade fisiológica da planta, estimulando a atividade do metabolismo.

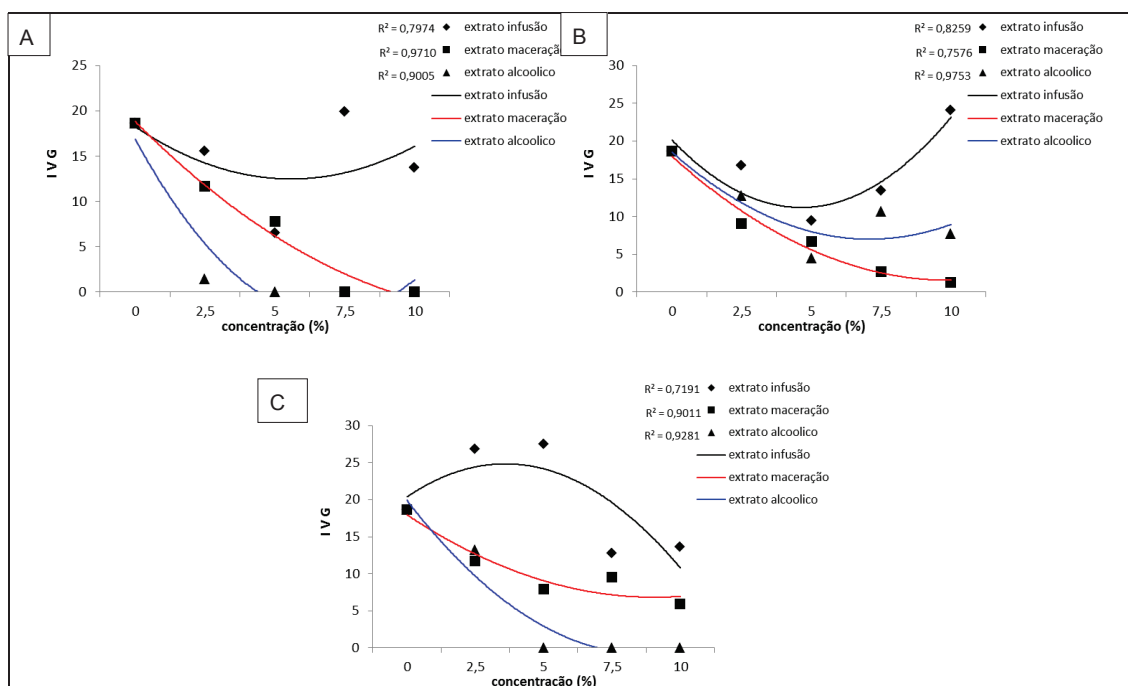


Figura 2. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculososo). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

A aplicação do extrato aquoso de Nim, sobre sementes de soja reduziu o IVG com o aumento da concentração do extrato, sendo este fator relatado como um problema, pois prejudica a colheita, por alterar a uniformidade na produção (RICKLI et al., 2011), fato que também foi observado neste experimento.

Essas alterações no processo de germinação da semente estão interligadas ao fluxo de água para o interior das células, que podem carregar consigo algumas substâncias alelopáticas podendo impedir ou retardar a divisão ou crescimento das células, resultando em um retardo da germinação (GONZALEZ et al., 2002). Para a cultura, retardamento da germinação é um fator desfavorável, pois pode aumentar o período de interferência das plantas daninhas sobre a cultura, desuniformidade do stand de plantas, dentre outros fatores.

Como pode ser observado na Tabela 3, o extrato alcóolico foi o que mais afetou o crescimento de raízes de milho, reduzindo em média 66,66% esta variável quando comparado a testemunha. Em relação às espécies testadas, os extratos de trevo branco resultaram em redução média de 57,78% do crescimento do sistema radicular da cultura do milho nos diferentes extratos.

Tabela 3. Comprimento de raiz (cm) de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			
	Branco	Vermelho	Vesiculoso	Média
Testemunha	15,46 aA	15,46 aA	15,46 aA	15,46 a
Infusão	7,96 bC	8,57 cB	9,99 bA	8,84 c
Maceração	7,44 bC	10,89 bB	14,00 aA	10,78 b
Alcólico	4,18 cB	6,93 dA	4,35 cB	5,15 d
Média	8,76 C	10,46 B	10,95 A	
CV	8,98			

Medias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na Figura 3, é possível observar que a aplicação dos extratos de trevo reduziu o comprimento médio da radícula quando comparado com a testemunha. Entre as formas de extração, os extratos alcóolico e infusão foram mais expressivos na redução do comprimento de raiz (CR).

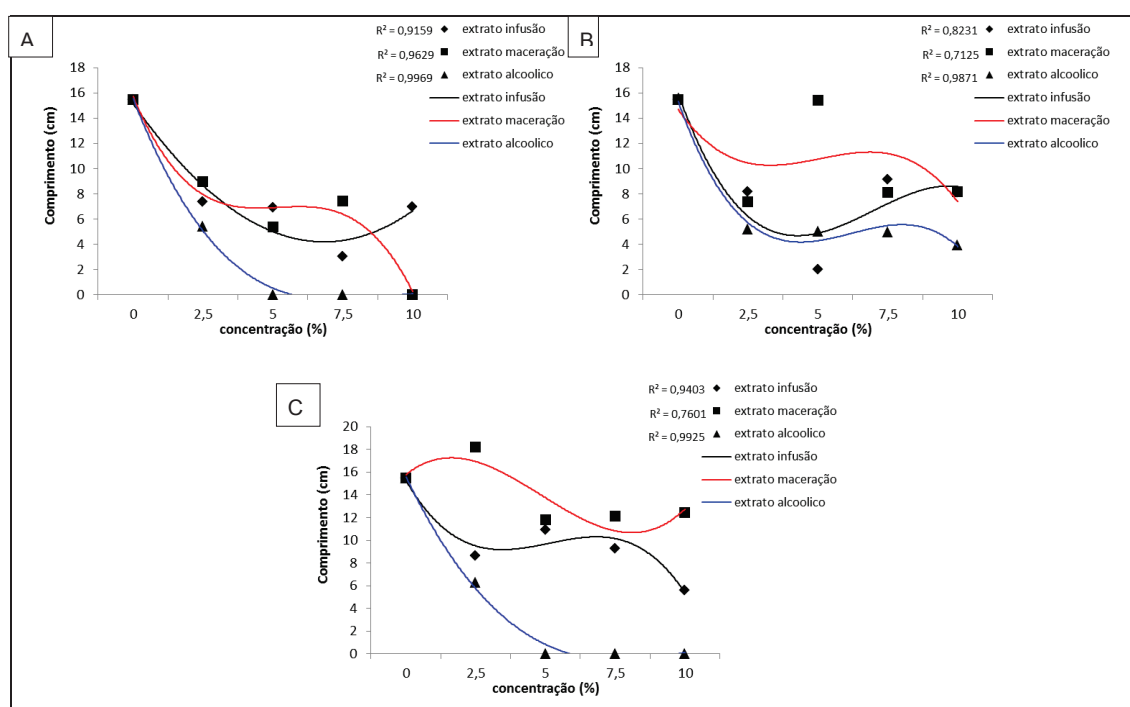


Figura 3. Comprimento de raiz (cm) de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Resultado semelhante foi encontrado por Rickli et al. (2011), aonde o aumento da concentração de extrato de Nim aplicado sobre as sementes de milho reduziu o comprimento médio de raiz. A aplicação do extrato aquoso de leucena sobre as sementes de milho reduziu o comprimento de raiz com o aumento da concentração,

assim como também o comprimento da parte aérea, massa seca da parte aérea e de raiz (PRATES et al., 2001). Segundo Ferrarese et al., (2000), os compostos fenólicos são potentes aleloquímicos que induzem o aumento da atividade de enzimas oxidativas, tendo consequência a modificação da permeabilidade da membrana e a formação de lignina, reduzindo o crescimento radicular.

Por outro lado Faria et al., (2009), observaram influência da aplicação de extrato aquoso de milho (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke) e mucuna (*Stizolobium aterrimum* Piper & Tracy) sobre o comprimento médio de raiz e do hipocótilo de milho, os quais estimularam o comprimento médio das duas variáveis. De acordo com Maraschin-silva; Aqüila (2006), a aplicação de extratos vegetais pode tanto inibir quanto estimular o crescimento de plântulas, devido a presença de aleloquímicos os quais causam modificações no funcionamento de membranas, na absorção de nutrientes e de água, e na atividade fotossintética e respiratória, entre outras.

De acordo com Sousa; Bortolon (2002), a redução do crescimento radicular diminui a absorção de nutrientes e água, consequentemente reduz a fotossíntese, resultando na diminuição do comprimento da planta e redução da produção.

Na Tabela 4 é possível observar que o extrato alcoólico resultou nos menores valores de CPA, sendo que o extrato alcoólico de trevo vesiculoso causou uma redução de aproximadamente 68,1%, porém não diferiu do extrato alcoólico de trevo branco que reduziu 66,8%.

Tabela 4. Comprimento de parte aérea (cm) de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			
	Branco	Vermelho	Vesiculoso	Média
Testemunha	12,47 aA	12,47 aA	12,47 aA	12,47 a
Infusão	6,77 bB	9,47 bA	9,39 bA	8,54 c
Maceração	6,89 bC	8,95 bB	12,05 aA	9,30 b
Alcoólico	4,14 cB	6,37 cA	3,98 cB	4,83 d
Média	7,56 B	9,31 A	9,47 A	
CV	9,47			

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Analisando as Figuras 3 e 4, é possível observar que o comportamento do comprimento de raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CPA) em relação ao aumento da concentração dos extratos foi similar, porém as variações nos valores de CPA foram menos expressivas do que CR.

No extrato por maceração de trevo vermelho e vesiculoso houve um ligeiro estímulo ao CPA nas menores concentrações dos extratos, esse fato também foi observado por Pires et al. (2001), aonde as menores concentrações de extrato aquoso de leucena estimularam o crescimento da parte aérea de plântulas de milho.

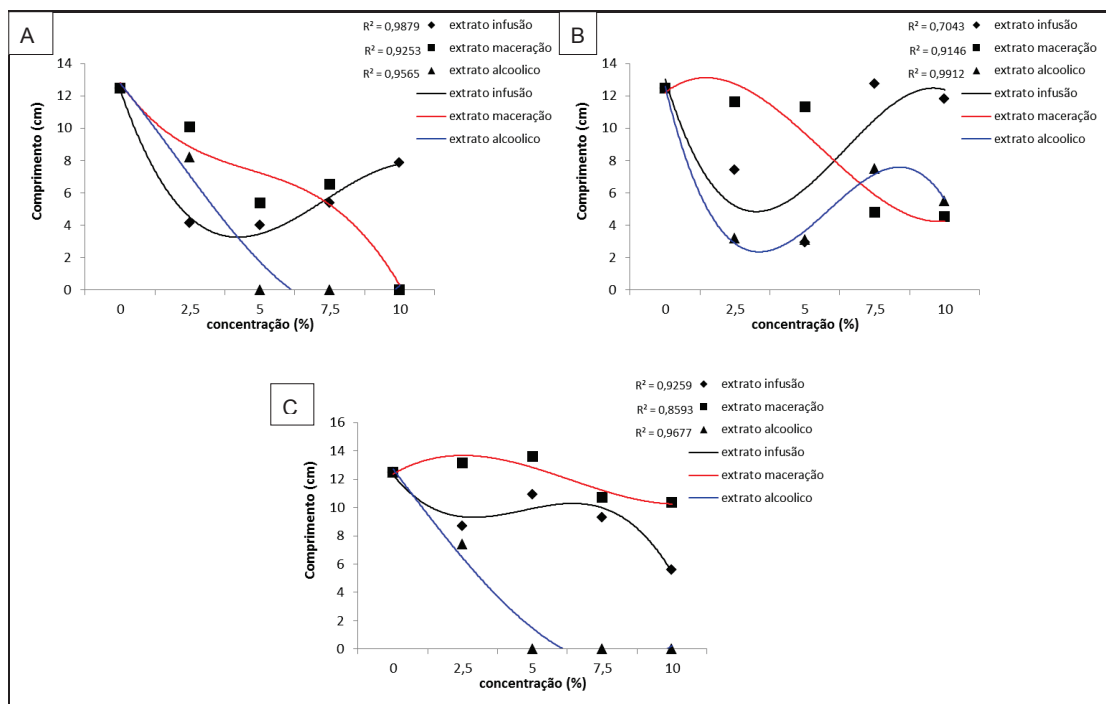


Figura 4. Comprimento (cm) de parte aérea de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Na Tabela 5 é plausível afirmar que os extratos à partir de trevo branco foram mais expressivos na redução da MSR (redução média de 40,49%), sendo que entre eles o extrato alcoólico resultou em uma inibição de aproximadamente 67,05 %.

Tabela 5. Massa seca (mg) de raiz de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculoso	
Testemunha	36,34 aA	36,34 aA	36,34 aA	36,34 a
Infusão	28,99 bB	38,40 aA	38,39 aA	35,26 a
Maceração	23,91 bB	27,63 bB	35,46 aA	29,00 b
Alcoólico	11,97 cB	32,04 abA	12,15 bB	18,72 c
Média	25,30 B	33,60 A	30,58 A	
CV	36,46			

Medias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na Figura 5 é possível observar que o aumento das concentrações dos extratos diminui a massa seca de raiz (MSR), exceto para os extratos infusão de trevo branco e vermelho, aonde na maior concentração do extrato houve pouca redução no teor de MSR quando comparado com a testemunha.

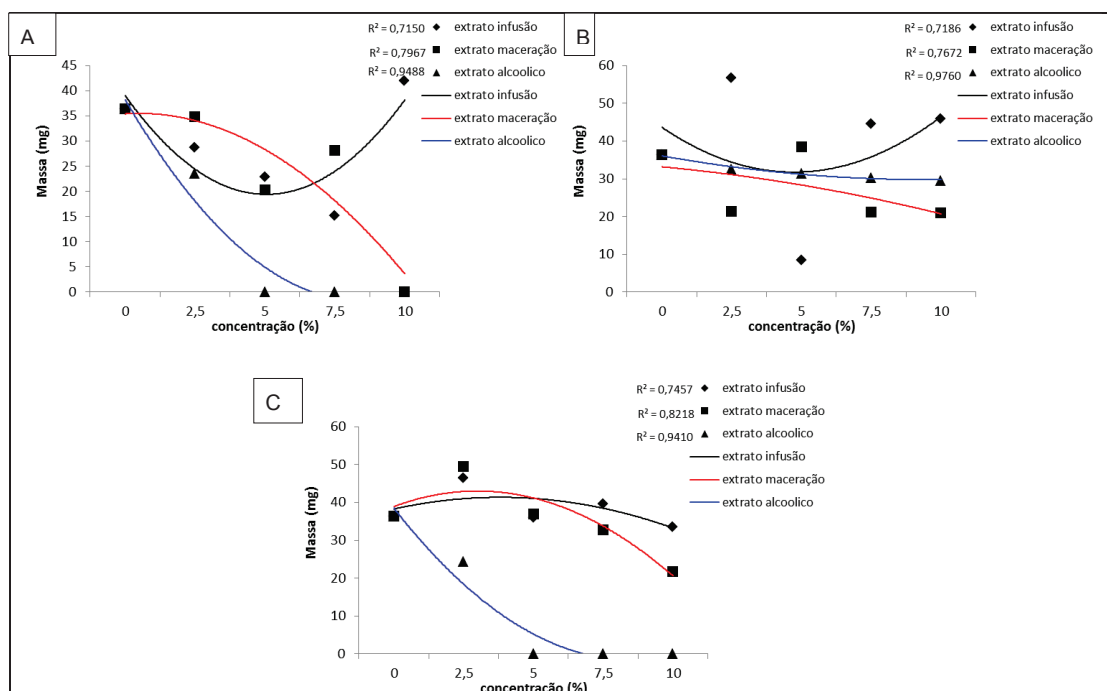


Figura 5. Massa seca (mg) de raiz de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Trabalhando com extrato aquoso de leucena sobre sementes de milho, Pires et al. (2001), observaram que o aumento da concentração do extrato diminuiu o comprimento e massa seca de raiz. Segundo os autores, a alteração no desenvolvimento da radícula é um dos principais indicadores do efeito alelopático de extratos vegetais, sendo que esta normalmente é a mais afetada pelos aleloquímicos.

Para massa seca da parte aérea (MSPA) os extratos que causaram as maiores reduções foi o alcoólico de trevo vesiculoso e trevo branco, com uma redução de aproximadamente 70,2 % e 68,4 % respectivamente (Tabela 6).

Por outro lado, o extrato por infusão dos trevos branco e vermelho apresentou redução do comprimento e massa seca da parte aérea e do sistema radicular até a concentração de 5%, a partir da qual houve um aumento dose dependente (Figura 5 e 6). Resultado semelhante foi obtido por Santos et al. (2002), trabalhando com aplicação de extrato de casca de café sobre sementes de caruru. De acordo com o au-

tor, o N presente na molécula de cafeína foi responsável pelo aumento do desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular, sendo este efeito mais expressivo do que o efeito de um possível aleloquímico presente no extrato de casca de café.

Tabela 6. Massa seca (mg) da parte aérea de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			
	Branco	Vermelho	Vesiculososo	Média
Testemunha	41,38 aA	41,38 aA	41,38 aA	41,38 a
Infusão	23,24 bC	33,08 bB	39,25 aA	31,86 b
Maceração	20,76 bB	23,31 cB	33,62 bA	25,90 c
Alcólico	13,07 cB	32,89 bA	12,33 cB	19,43 d
Média	24,59 B	33,66 A	31,64 A	
CV	14,71			

Medias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Avaliando de maneira conjunta as Figuras 3, 4, 5 e 6, é possível observar que apesar de haver algumas oscilações entre as concentrações, no geral, o aumento da concentração dos extratos de trevo diminuiu o comprimento e massa seca tanto da parte aérea como do sistema radicular de plântulas de milho.

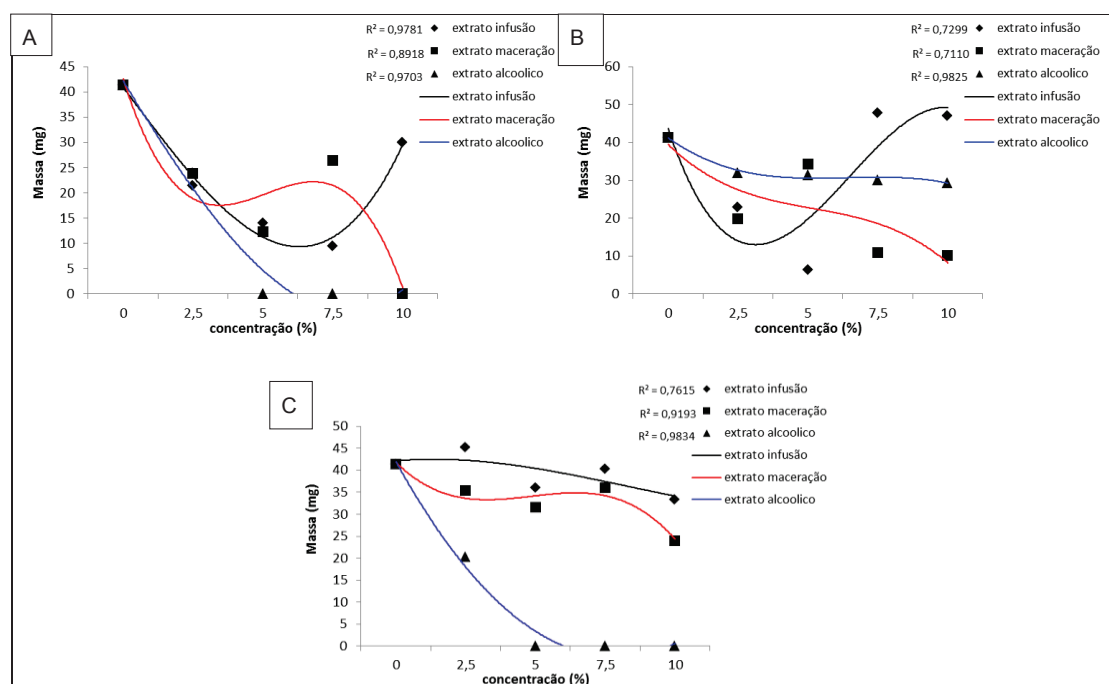


Figura 6. Massa seca (mg) da parte aérea de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculososo). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Segundo Ferreira; Áquila (2000), as modificações no padrão de desenvolvimento inicial e germinação podem ser resultados de inúmeros efeitos primários, como por exemplo, modificação na permeabilidade da membrana, respiração, conformação de enzimas e seus receptores, transcrição e tradução do DNA e ou no comportamento de mensageiros secundários. Ou seja, as alterações observadas no crescimento de raiz e parte aérea, assim como a massa seca de raiz e parte aérea, podem ser resultado de alterações primárias no metabolismo da planta devido ao estresse causado por um composto ainda não identificado dos extratos de trevo.

O extrato vegetal normalmente não apresenta efeito alelopático significativo sobre a germinação das sementes e sim sobre o desenvolvimento do sistema radicular e parte aérea, já que estes parâmetros são mais sensíveis a presença de um aleloquímico no meio (FERREIRA; ÁQUILA, 2000). Porém os resultados obtidos neste trabalho demonstram que os extratos de trevo apresentaram efeito tanto sobre a germinação das sementes quanto sobre o desenvolvimento do sistema radicular e aéreo, destacando desta forma o potencial de interferência dos extratos de trevo sobre as sementes e plântulas de milho.

Na avaliação dos teores de açúcares redutores (AR) é possível observar que para o extrato infusão e maceração, o trevo vermelho foi o que resultou nos menores níveis de AR quando comparado com outros trevos. Por outro lado, para extrato alcoólico, o trevo vermelho foi o que apresentou os maiores teores de AR (Tabela 7).

Tabela 7. Teores de açúcares redutores (mg/g de tecido vegetal) de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			
	Branco	Vermelho	Vesiculososo	Média
Testemunha	0,0992 bA	0,0992 bA	0,0992 bA	0,0992 b
Infusão	0,1161 aAB	0,1153 aB	0,1307 aA	0,1206 a
Maceração	0,0862 bB	0,0859 bB	0,1055 bA	0,0925 b
Alcoólico	0,0312 cB	0,1044 aA	0,0344 cB	0,0566 c
Média	0,0832 C	0,1012 A	0,0924 B	
CV	22,01			

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Todos os extratos dos trevos apresentaram redução nos teores de AR com o aumento da concentração, exceto para os extratos por infusão, os quais, quando comparado com a testemunha, apresentaram acréscimos nos valores de AR com a elevação da concentração (Figura 7).

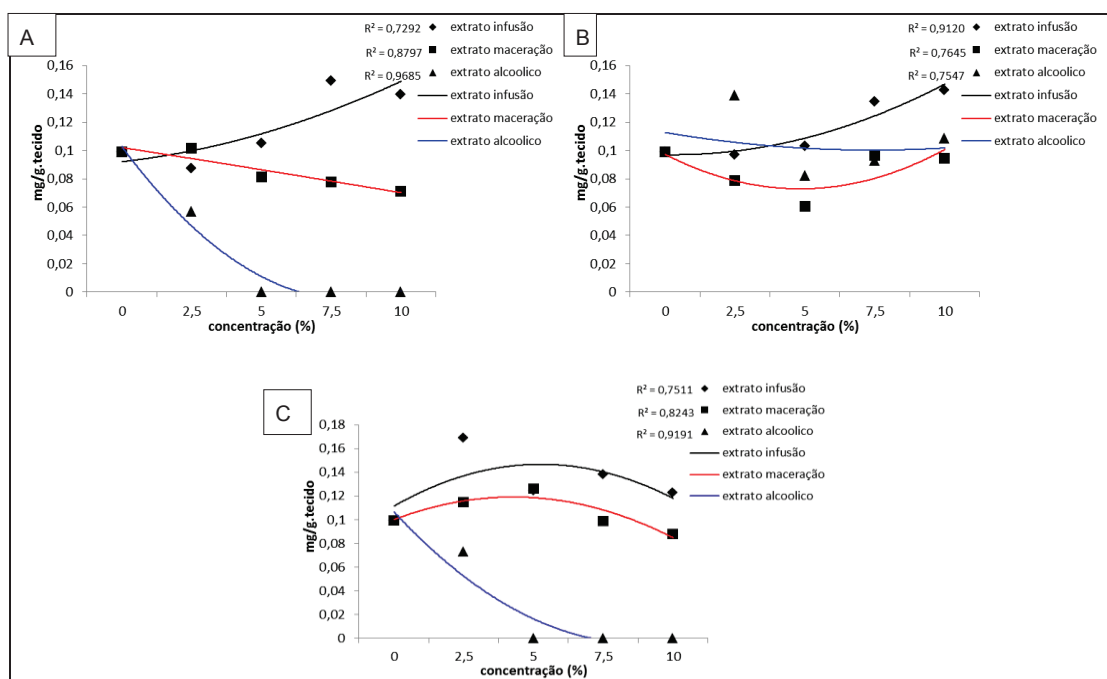


Figura 7. Teores de açúcares redutores de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). Dois Vizinhos, 2013.

Para a variável açúcares solúveis totais (AST) o extrato alcoólico de trevo branco e vesiculoso resultaram nos menores teores de AST em plântulas de milho (Tabela 8).

Tabela 8. Teores de açúcares solúveis totais (mg/g de tecido vegetal) de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculoso	
Testemunha	3,1201 aA	3,1201 aA	3,1201 aA	3,1201 a
Infusão	2,9161 bB	3,1211 aB	3,7089 aA	3,2487 a
Maceração	2,3633 cA	2,3775 bA	2,0515 bA	2,2641 b
Alcoólico	1,1360 dB	2,0011 bA	0,9105 cB	1,3492 c
Média	2,3839 B	2,6549 A	2,4477 AB	
CV	28,67			

Medias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os teores de AR e AST observados demonstraram o efeito dos tratamentos sobre a alteração do metabolismo primário vegetal. Os níveis de AR e AST foram inferiores nos tratamentos quando se utilizou o extrato alcoólico nas espécies de trevo branco e vesiculoso, em comparação aos tratamentos com infusão e maceração.

Tais dados podem ser relacionados com os obtidos nos testes de análises de sementes e plântulas, pois verificou-se que os tratamentos com extrato alcoólico reduziram a germinação (Figura 1), IVG (Figura 2), CR (Figura 3), CPA (Figura 4), MSR (Figura 5) e MSPA (Figura 6).

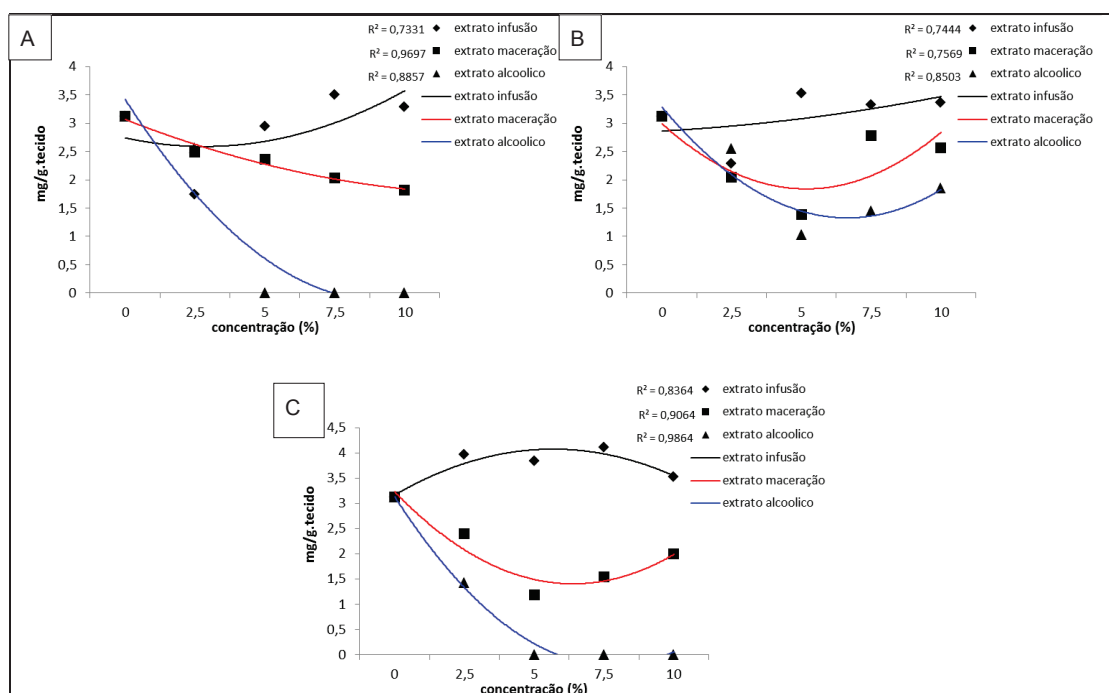


Figura 8. Teores de açúcares solúveis totais de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Possivelmente a extração alcoólica possui maior capacidade de extração de metabólitos secundários presentes nos trevos, que o processo de infusão e maceração. E estes metabólitos tiveram ação alelopática sendo demonstrada através da inibição do metabolismo primário e consequente inibição dos parâmetros agrônômicos sobre as sementes e plântulas de milho.

A inibição dos teores de açúcares redutores (glicose, manose e frutose) e açúcares totais (reduzidos e sacarose) estão relacionados à diminuição da atividade metabólica das plantas induzidas, pois os ciclos metabólicos estão integrados e um processo de indução de compostos do metabolismo secundário, podendo afetar o metabolismo primário do carbono, como a glicólise, pentose fosfato ou ciclo do ácido cítrico.

Segundo Marcos Filho (2005), os compostos fenólicos podem interferir na difusão de gases na célula vegetal, em especial do oxigênio, reduzindo a atividade do

metabolismo celular. Ainda segundo Chagas et al. (2011), o metabolismo primário e secundário estão em constante competição, sendo um deles favorecido dependendo das necessidades da planta. Para estes autores, normalmente quando a planta é submetida a algum tipo de estresse, os fotoassimilados são preferencialmente destinados ao metabolismo secundário, o qual é responsável pela defesa vegetal.

As menores concentrações de proteína foram observadas nos extratos alcoólicos de trevo branco e vesiculososo com redução de aproximadamente 39,24% e 49,13% respectivamente (Tabela 9) em comparação a testemunha.

Tabela 9. Teores de proteína (mg) de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculososo	
Testemunha	0,5062 bA	0,5062 bA	0,5062 bA	0,5062 a
Infusão	0,5235 bA	0,5833 bA	0,6060 aA	0,5709 a
Maceração	0,6548 aA	0,6908 aA	0,3607 cB	0,5688 a
Alcoólico	0,3076 cB	0,7678 aA	0,2575 dB	0,4443 b
Média	0,4980 B	0,6370 A	0,4326 C	
CV	24,24			

Medias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em todos os extratos de trevo vermelho houve elevação nos valores de proteínas com o aumento da concentração, fato este também observado nos extratos maceração e infusão de trevo branco, e infusão de trevo vesiculososo. Para os demais extratos, a elevação concentração diminuiu os valores de proteínas (figura 9).

De acordo com Ferreira; Áquila (2000), os aleloquímicos podem afetar síntese de pigmentos, fotossíntese, respiração, síntese de proteínas, atividade enzimática, dentre outras alterações no metabolismo da planta alvo. Na maioria das vezes essas alterações são específicas, mas como o metabolismo é formado por uma série de rotas interligadas, a mudança de um único processo pode alterar uma série de rotas metabólicas. Sendo assim é difícil de mensurar o efeito específico de um aleloquímico.

Porém sabe-se que os aleloquímicos apresentam potencial de inibição ou estímulo da germinação e desenvolvimento inicial. Estes sintomas são reflexos secundários da ação do aleloquímico, que ao inibir, danifica ou inativa vias do sistema metabólico da semente ou plântula, alterando a bicamada fosfolipídica e o sistema de

membranas celulares, o comportamento celular, fitormonal ou fotossintético (CHOU, 2006), resultando num desbalanço no metabolismo da planta.

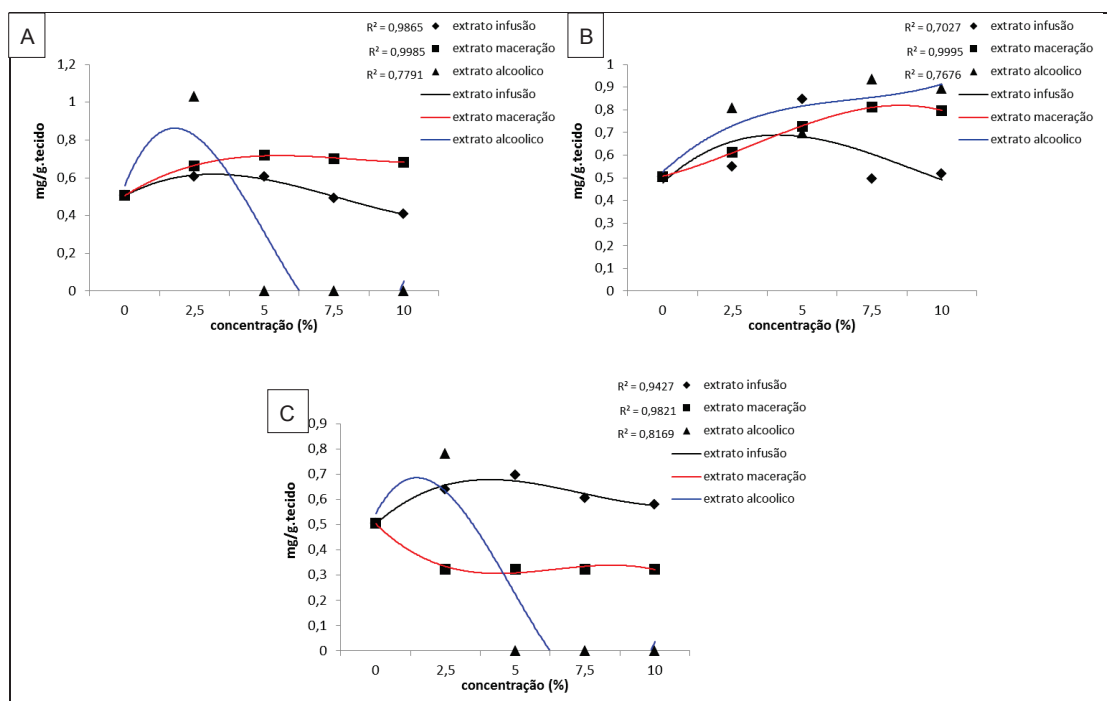


Figura 9. Teores de proteína de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

A variável, atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) não apresentou interação tripla entre os fatores testados, apresentou apenas interação entre a concentração do extrato e a forma de extração.

A atividade da FAL em plântulas de milho apresentou comportamento diferenciado em relação aos tipos de extração e as espécies de trevo, sendo que a infusão e a maceração das espécies de trevo branco e vesiculoso estimularam a atividade da FAL, já para o trevo vermelho a maior expressão foi para a infusão. Também pode-se observar que o extrato alcoólico de trevo branco e vesiculoso demonstrou menor atividade enzimática em plântulas de milho (figura 10).

O comportamento diferenciado do extrato por infusão de trevo branco, o qual em altas concentrações favoreceu a germinação e estimulou a atividade da FAL, pode estar relacionado com a riqueza de compostos presentes no extrato bruto, já que não foi realizado o isolamento dos compostos. É possível que este extrato em particular tenha extraído algum composto específico que interagiu com o possível aleloquímico. Porém esta interação não é tão expressiva quando em baixas concentrações.

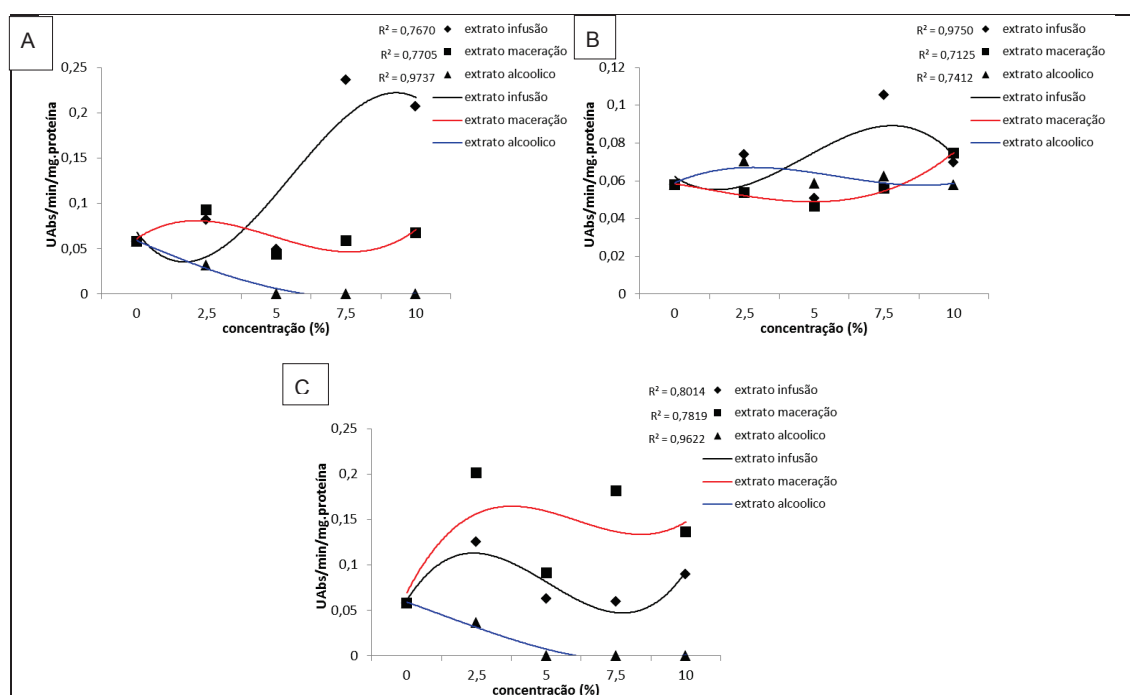


Figura 10. Atividade da enzima fenilalanina amonia-liase (FAL) de plântulas de milho (*Zea mays*) em bebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Sausen et al., (2009) ressaltam que a alelopátia é definida como a interferência positiva ou negativa de compostos do metabolismo secundário produzidos por uma planta e lançados ao meio. A interferência geralmente ocorre sobre os fitormônios, causando uma desregulação no metabolismo da planta, afetando dentre outros fatores a atividade enzimática.

A atividade enzimática está muito relacionada ao estímulo vegetal e ao tempo após tal estímulo. Considerando que os preparados possuem aleloquímicos que atuam inibindo ou ativando rotas metabólicas, e que o comportamento enzimático pode ser variável em função do tempo, pode-se considerar que no momento das análises bioquímicas, ou seja, no final do experimento, os níveis da atividade da FAL não permitiriam expressar seu comportamento. Considerando que sua maior atividade possa ter ocorrido em momentos diferentes da avaliação, ou seja, em intervalos não observados nesse experimento. Para isso, sugere-se novos estudos que contemplem a avaliação da atividade da enzima FAL no decorrer do experimento, com intervalos de 12 a 24 horas, o que permitirá a avaliação de sua real atividade.

À partir dos espectros de infravermelho, obtidos dos diferentes extratos (Figura 11), é possível observar que pela intensidade de absorção, o extrato alcoólico foi

o que mais possibilitou uma maior concentração de compostos, exceto para o trevo branco, aonde a extração por infusão apresentou maior concentração de compostos que o alcoólico.

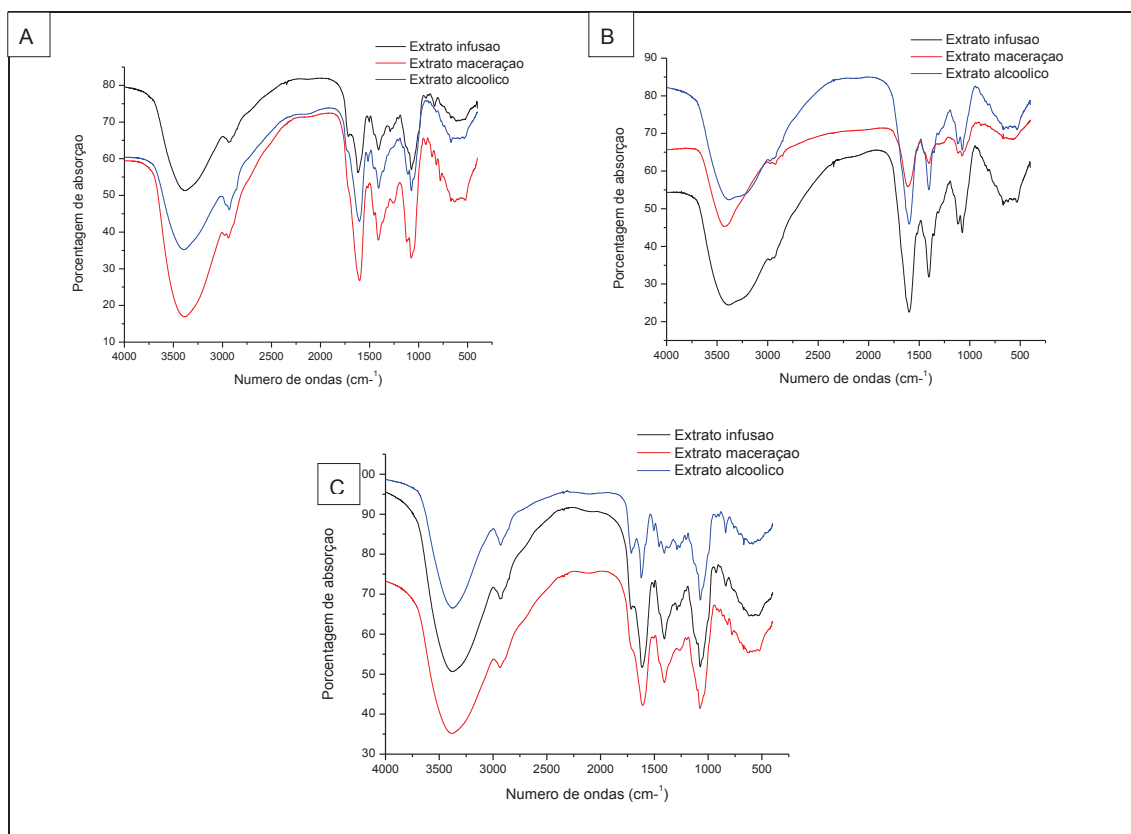


Figura 11. Espectro infravermelho dos extratos de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Em relação aos grupos funcionais, observou-se que em todos os extratos há a presença do grupo funcional álcoois e fenóis, com absorção característica de duas bandas, sendo uma banda larga de O-H na região de $3.400-3.300\text{ cm}^{-1}$ e outra banda C-O na região de $1.300-1.000\text{ cm}^{-1}$, há também a presença de anel aromático com absorção característica na faixa de $1.600-1.450\text{ cm}^{-1}$ (figura 11).

Com base nestes grupos funcionais é possível confirmar a presença de compostos fenólicos em todos os extratos de trevo, pois estes são basicamente formados por um grupo hidroxila e um anel aromático, sendo estes os principais componentes de substâncias alelopáticas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Em relação aos processos de extração é possível observar que o extrato alcoólico foi mais eficiente na extração de compostos orgânicos da matéria seca de trevo, seguido do extrato por infusão e maceração respectivamente, exceto para a

espécie de trevo branco, aonde a extração por infusão se sobressaiu aos demais processos de extração. Essa observação é baseada na quantidade de picos presentes no espectro.

Em relação às espécies de trevo, observou-se que para os extratos maceração e infusão, não houve diferença no espectro obtido a partir de trevo branco e vesiculoso, porém o espectro obtido a partir de trevo vermelho foi diferente em relação às outras espécies de trevo.

Por sua vez os espectros obtidos dos extratos alcoólicos foram diferentes entre as três espécies de trevo, demonstrando que etanol é mais eficiente na extração de compostos do que a água. Esse fato pode estar relacionado com a polaridade da molécula de etanol, a qual possui uma extremidade polar e outra apolar, diluindo assim tanto substâncias polares como apolares. Por sua vez, a molécula de água é considerada polar, ou seja, dilui apenas substâncias polares.

Segundo Taiz; Zeiger (2013) os compostos fenólicos vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos, sendo alguns solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são solúveis em água e outros que são praticamente insolúveis.

Em relação aos métodos de infusão e maceração, pode-se dizer que a maior temperatura utilizada na infusão (100°C) tenha favorecido a diluição dos compostos na água. Segundo Watanabe et al. (2006), as temperaturas mais altas frequentemente favorecem a solubilidade do soluto no solvente.

Dentre os compostos fenólicos que podem ser encontrados nos trevos, Taiz; Zeiger (2013) relatam a presença dos isoflavonóides, que possuem várias atividades biológicas destacando atividades antifúngicas e antibacterianas (fitoalexinas), atividade estrogênica e propriedades inseticidas.

Correlacionado os resultados obtidos nos espectros dos extratos, com os dados do efeito dos mesmos sobre as sementes de milho é possível afirmar que os extratos alcoólicos dos trevos foram mais eficiente na redução da germinação e desenvolvimento inicial da sementes, por apresentar uma maior quantidade de compostos extraídos. Resultado semelhante foi obtido por Oliveira et al., (2002), aonde o extrato alcoólico de jatobá do serrado apresentou maior efeito alelopático sobre sementes de alface que o extrato aquoso. Segundo este mesmo autor esse efeito provavelmente esteja relacionado à maior capacidade do solvente orgânico de retirar do material vegetal, maiores quantidades e ou substâncias inibidoras específicas.

Avaliando o efeito dos extratos, sob os caracteres agronômicos e bioquímicos, o extrato de trevo branco de maneira geral foi o que causou as maiores alterações negativas sobre as sementes de milho.

Isolando o efeito da forma de extração e avaliando apenas o efeito da espécie de trevo, é possível observar que nos extratos maceração e infusão de trevo branco e vermelho, houve as maiores supressões do desenvolvimento das sementes. Apesar de nestas formas de extração o espectro de trevo branco ser muito parecido com os obtidos em trevo vesiculoso, este último apresentou menor efeito que o trevo vermelho, que apresentou espectro diferente das outras duas espécies de trevo.

Para o extrato alcoólico os espectros obtidos das espécies de trevo foram diferentes entre si, porém o efeito sobre as sementes de milho foi semelhante entre o trevo branco e trevo vesiculoso, sendo estes os que causaram os maiores efeitos negativos sobre as sementes de milho. Por sua vez o extrato alcoólico de trevo vermelho apresentou menos interferência.

Apesar do processo de infusão ter extraído maior quantidade de compostos que a maceração, o efeito sobre as sementes foi oposto, ou seja, o extrato por maceração apresentou maior interferência sobre o desenvolvimento inicial de sementes de milho. Possivelmente esteja relacionado com a temperatura (100 °C) utilizada no processo de infusão, que pode ter desativado ou desestruturado o aleloquímico, diminuindo seu efeito na supressão do desenvolvimento das sementes de milho.

Os resultados obtidos demonstram a necessidade de desenvolver estudos sobre a interação entre as plantas no sistema de rotação de culturas. Pois a interação entre elas pode não ter o efeito esperado, como por exemplo, a rotação de trevo com milho, que inicialmente seria vantajoso pelo fato de o trevo fixar nitrogênio, porém a liberação de aleloquímicos pode prejudicar o desenvolvimento inicial da cultura. Também há a necessidade de desenvolver estudos para avaliar se este mesmo efeito encontrado em laboratório ocorrerá no campo, considerando a presença de vários fatores ambientais interferindo sobre os aleloquímicos.

2.6 CONCLUSÕES

Trevo branco, trevo vermelho e trevo vesiculoso nas diferentes formas de extração apresentam efeito alelopático em sementes e plântulas de milho, com destaque para o extrato alcoólico de trevo branco.

Os principais compostos identificados nos espectros dos extratos de trevo foram os compostos fenólicos, sendo estes sugeridos como responsáveis pelo efeito alelopático.

Os efeitos alelopáticos verificados variaram, em função da forma de extração, bem como das concentrações.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC nº 10, de 9 de Março de 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html>. Acessado em: 27/março/2014.

ARGENTA, Gilber; SILVA, Paulo. R. F. da; FLECK, Nilson. G; BORTOLINI, Clayton. G; NEVES, Rodrigo; AGOSTINETTO, Dirceu. Efeitos do manejo mecânico e químico da aveia-preta no milho em sucessão e no controle do capim-papuã. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v. 36, n. 6, p. 851-860, 2001.

BRADFORD, M.M; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.72, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 1º edição, p. 399, 2009.

CATTELAN, Letícia.V; STEIN, Vanessa.C; HEIDEN, Gustavo; BUTTOW, Míriam.V; BOBROWSKI, Vera.L. Atividade alelopática de extratos aquosos de diferentes espécies de *Plantago* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 210-212, 2007.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA,

P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos. Piracicaba: FEALQ, p.81-124, 2005.

CHAGAS, Jorge. H; PINTO, Jose.E.B.P; VILELA, BERTOLUCCI, Suzan.K.V; SANTOS, Fúlvia.M.do. Produção de biomassa e teor de óleo essencial em função da idade e época de colheita em plantas de hortelã-japonesa. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 2, p. 327-334, 2011.

CHOU, C.H. Introduction to allelopathy. Em REIGOSA, M.J; PEDROL, N; GONZALEZ, L. **Allelopathy: A physiological process with ecological implications**. Springer. Dordrecht, Holanda, p.637, 2006.

DUBOIS, Michel.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, Fred. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal.Chem.**, 28: 350-356, 1956.

FARIA, T. M.; GOMES JUNIOR, F. G.; SÁ, M. E. de; CASSIOLATO, A. M. R. Efeitos alelopáticos de extratos vegetais na germinação, colonização micorrízica e crescimento inicial de milho, soja e feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1625-1633, 2009.

FERRARESE, M.L.L; SOUZA, N.E; FERRARESE FILHO, M.L.L. Ferulic acid uptake by soybean root in nutriente culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.22, p.121-124, 2000.

FERREIRA, A. G. Interferência: competição e alelopatia, In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, cap. 16, 2004.

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

GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botânica Brasilica**, v.18, n.3, p.459-472, 2004.

GOMES, Fernanda. M; FORTES, Andréa. M.T; SILVA, Jéssica; BONAMIGO, Thaliny; PINTO, Tassiane. T. Efeito alelopático da fitomassa de *Lupinus angustifolius* (L.) sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Zea mays* (L.) e *Bidens pilosa* (L.).

Rev. Bras. de Agroecologia, v.8, n.1, p.48-56, 2013.

GONZALEZ, H.R. et al. Efectos alelopáticos de restos de diferentes espécies de plantas medicinales sobre la albahaca (*Ocimum basilicum* L.) em condiciones de laboratório. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.7, n.2, p.67-72, 2002.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. 140p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

MARASCHIN-SILVA, Fabiana; AQÜILA, Maria.E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta botânica Brasileira**, v.20, n.1, p. 61-69, 2006.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005, 495 p.

MAZZAFERA, Paulo Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasil. Bot.**, v.26, n.2, p.231-238, 2003.

MENDEZ, A.S.L; SIMIONATO, N.O; VALDUGA, A.T; REGINATTO, F.H. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista Ciência Farmacológica Básica e Aplicada**, v.32, n. 1, p. 105-111, 2011.

MILLER, Gail. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.416-428, 1959.

MORAES, Pedro. V. D. de; AGOSTINETTO, Dirceu; PANOZZO, Luis. E; GALON, Leandro; OLIVEIRA, Claudia; DAL MAGRO, Taísa. Potencial alelopático de extratos aquosos de culturas de cobertura de solo na germinação e desenvolvimento inicial de *Bidens pilosa*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.4, p.1299-1314. 2012.

NÓBREGA, Lúcia.H.P; LIMA, Gislaine, P.DE; MARTINS, Gislaine.I; MENHGHETTI, Adriana.M. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de soja (*Glycine max* L. Merrill) sob cobertura vegetal. **Acta Scientiarum, Agronomy**. Maringá, v.31, n.3, p.461-465, 2009.

OLIVEIRA, N. S.; MERCADANTE, M.O; LOPES, P. S. N.; GOMES, I. A. C; GUSMÃO, E.; RIBEIRO, L. M. Efeitos alelopáticos dos extratos aquoso e etanólico de jatobá do cerrado. **Unimontes Científica**. Montes Claros, v.4, n.2, 2002.

PETRY, R.D; REGINATTO, F; DE-PARIS, F; GOSMANN, G; SALGUEIRO, J.B; QUEVEDO, J; KAPCZINSKI, F; GONZÁLEZ, G.O; SCHENKEL, E.P. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**. v.15, p.162-164, 2001.

PIRES, Nádja.de.M; SOUZA, Isabel.R.P; PRATES, Hélio.T; FARIA, Trícia.C.L.de; PEREIRA FILHO, Israel.A; MAGALHÃES, Paulo.C. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v.13, n.1, p.55-65, 2001.

POLITYCKA, B; GMEREK, J. Effect of ferulic and p-coumaric acidson the scivity of hydrolytic enzymes and growth of radicals in germinating seeds of cucumber and pea. **Allelopathy J**. v.21, p.227-238, 2008.

PRATES, Hélio.T, PAES, José.M.V; PIRES, Nádja.de.M; PEREIRA FILHO, Israel.A; MAGALHÃES, Paulo.C. Efeito do extrato aquoso de leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.35, n.5, p.909-914, 2001.

RICKLI, Helena.C; FORTES, Andrea.M.T; SILVA, Paulo.S.S; PILATTI, Daiane.M; HUTT, Daniele.R. Efeito alelopático de extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. em alface, soja, milho, feijão e picão preto-preto. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.32, n.2, p.473-484, 2011.

SANTOS, Julio. C. F; SOUZA, Itamar. F. de; MENDES, Antônio. N. G. M; MORAIS, Augusto. R. de; CONCEIÇÃO, Heráclito. E. O. da; MARINHO, José. T. S. Efeito de extratos de cascas de café e de arroz na emergência e no crescimento do caruru-de-mancha. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.37, n.6, p.783-790, 2002.

SAUSEUN, Tanise.L.; LOWE, Tatiana. R.; FIGUEREDO, Luciana. S; BUZATTO Cristiano.R.; Avaliação da atividade alelopatica do extrato aquoso de folhas de *Eugenia involucrata* dc. e *Acca sellowiana* (o. berg) Burret. **Polibotânica**, México, n.27, p.145-158, 2009.

SOUSA, Rogério O. de; BORTOLON, Leandro. Crescimento radicular e da parte aérea do arroz (*oryza sativa* l.) e absorção de nutrientes, em solução nutritiva com dife-

rentes concentrações de ácido acético. **R. bras. Agrociência**, v.8, n.3, p.231-235, 2002.

SOUZA FILHO, A.P.S. Atividade potencialmente alelopática de extratos brutos e hidroalcoólicos de feijão-de-porco (*canavalia ensiformis*). **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.20, n.3, p.357-364, 2002.

SOUZA, L.S; VELINI, E.D; MARTINS, D; ROSOLEM, C.A. Efeito alelopático de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) sobre o crescimento inicial de sete espécies de plantas cultivadas. **Planta daninha**, Viçosa, v.24 n.4, 2006.

SOUZA, S.A.M.; CATTELAN, L.V.; VARGAS, D.P.; PIANA, C.F.B.; BOBROWSKI, V.L.; ROCHA, B.H.G. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul sobre a germinação de sementes de alface. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**, Ponta Grossa, v.11, n. 3/4, p. 29-38, 2005.

SPIASSI, Ariane; FORTES, Andréa.M.T; PEREIRA, Dércio.C; SENEM, Jaqueline; TOMAZONI, Dayana. Alelopatia de palhadas de coberturas de inverno sobre o crescimento inicial de milho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.32, n.2, p.577-582, 2011.

TAIZ, Lincon.; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia vegetal**; Tradução: DIVAN JUNIOR et al., 5o ed., Porto Alegre: Artmed, p.918, 2013.

TOKURA, Luciene. K; NÓBREGA, Lúcia. H. P; Potencial alelopático de cultivos de cobertura vegetal no desenvolvimento de plântulas de milho. **Acta Sci. Agron.** Maringá, v.27, n.2, p.287-292, 2005.

VERDI, Luiz.G; BRIGHENTE, Inês.M.C; PIZZOLATTI, Moacir.G. Gênero *baccharis* (asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v.28, n.1, p.85-94, 2005.

WARDLE, A.D. AHMED, M.; NICHOLSON, K.S., Allelopathic influence of nodding thistle (*Carduus nutans* L.) seed on germination and radicle growth of pasture plants. **Journal Agriculture Research**, New Zealand, v.34, n.2, p.185-191, 1991.

WATANABE, C.B; NOSSE, T.M; GARCIA, C.A; PINHEIRO, N.P. Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v.8, n.4, p.76-86, 2006.

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

3 CAPÍTULO II - ALELOPATIA DE ESPÉCIES DE TREVOS SOBRE SEMENTES DE *Digitaria* sp.

3.1 RESUMO

A técnica de adubação verde é muito utilizada no sistema de plantio direto, pois melhora as características químicas, físicas e biológicas do solo, recentemente tem sido utilizado, como controle de plantas daninhas, através da interferência física da cobertura verde, e da interferência química dos aleloquímicos liberados no solo. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial alelopático dos trevos branco, vermelho e vesiculoso em diferentes concentrações de extratos e obtidos por maceração, infusão e alcoólico, sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas de milhã. Avaliou-se em esquema fatorial 3 x 3 x 5, os extratos obtidos por infusão, maceração e alcoólico das espécies de trevo branco, trevo vermelho e trevo vesiculoso, em quatro concentrações dos extratos (2,5; 5,0; 7,5 e 10%) e testemunha (água destilada), respectivamente. Foram semeadas 100 sementes em caixa gerbox contendo duas folhas de papel mata-borrão, constituindo a unidade experimental, em quatro repetições, os quais foram umedecidos com os diferentes extratos e ou água destilada, conforme tratamentos. O teste de germinação seguiu as Regras Oficiais de Análises de Sementes (RAS) e foi instalado em câmara de crescimento (BOD) com fotoperíodo de 12/12 h luz/escuro e temperatura de 25 ±1°C. As avaliações de germinação foram realizadas diariamente, e no final do experimento com 10 dias, foi mensurado o índice de velocidade de germinação (IVG) e o comprimento de raiz (CR) e parte aérea (CPA), massa seca de raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA). Para amparar os resultados obtidos, foi realizado o espectro de infravermelho dos extratos. Observou-se que todos os extratos apresentaram efeito sobre as sementes de milhã, causando redução da germinação, IVG, CR, CPA, MSR, MSPA. As espécies de trevos branco, vermelho e vesiculoso nas diferentes formas de extração apresentam efeito alelopático em sementes e plântulas de milhã, com destaque para o extrato alcoólico de trevo vermelho. Analisando os espectros foi possível observar a presença de compostos fenólicos em todos os extratos. Os efeitos alelopáticos verificados variaram, em função da forma de extração, bem como das concentrações.

Palavras-chave: Poaceae, Isoflavonóides, Metabólitos secundários, *Trifolium* sp., Milhã.

3.2 ABSTRACT

The technique of green manure is widely used in the tillage system, it improves the chemical, physical and biological soil properties, and recently has been used as weed control through physical interference of green cover, and chemical interference allelochemicals released into the soil. The objective of this study was to evaluate the allelopathic potential of white, red and vesiculosum clovers at different concentrations of extracts obtained by maceration, infusion and alcohol on seed germination and early seedling development of large crabgrass. Was evaluated in a factorial 3 x 3 x 5, the extracts obtained by infusion, maceration and alcoholic species of white clover, red clover and clover at four concentrations (2.5, 5.0, 7.5 and 10 %) and control (distilled water), respectively. 100 seeds were sown in seedling box containing two sheets of blotting paper, constituting the experimental unit in four replicates, which were moistened with different extracts or distilled water as treatments. The germination followed the Official Rules for Seed Analysis (RAS) and was installed in a growth chamber (BOD) with a photoperiod of 12/12 h light / dark and temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Germination evaluations were performed daily, and at the end of the experiment 10 days, measured the germination speed index (GSI) and root length (RL) and shoot (SL), root dry weight (MSR) and 's (MSPA). To support the results obtained, the infrared spectrum of the extracts was performed. It was observed that all the extracts showed effect on the seeds of large crabgrass, causing reduced germination, GSI, RL, SL, MSR, MSPA. The species of white, red and vesiculosum clovers in different forms of extraction have allelopathic effects on seeds and seedlings of large crabgrass, especially the alcoholic extract of red clover. Analyzing the spectra we could observe the presence of phenolic compounds in all extracts. The allelopathic effects seen varied, depending on the form of extraction and the merger.

Keywords: Poaceae, Isoflavones, Secondary Metabolites, *Trifolium* sp., Watergrass.

3.3 INTRODUÇÃO

O gênero *Digitaria* sp., está entre as plantas daninha que mais influenciam negativamente o crescimento, desenvolvimento e a produtividade de muitas culturas, especialmente devido ao seu grande potencial de competição, além de interferir na colheita, secagem, beneficiamento dos grãos e ainda servir de hospedeiro de pragas e doenças (FERREIRA; SOUZA; FARIA, 2007), necessitando assim de métodos eficientes de controle.

Neste sentido, a técnica de adubação verde, muito utilizada pelos agricultores no sistema de semeadura direta, tem sido cada vez mais estudada, pois possui a capacidade de controle de plantas daninhas, o qual ocorre devido a combinação de fatores físicos e aleloquímicos, além de outros benefícios como, por exemplo, proteção do solo, reciclagem de nutrientes, fixação nitrogênio, entre outros (TEIXEIRA et al., 2004).

Assim o conhecimento das relações entre os adubos verdes e as plantas daninhas, permite um controle mais eficiente destas pela alelopatia, a qual é determinada como sendo, a liberação de metabólitos secundários no ambiente, que impedem ou favorecem o desenvolvimento e ou germinação de plantas vizinhas, sendo esses efeitos intercedidos por substâncias de diferentes categorias químicas do metabolismo secundário (ALVES et al., 2004).

Por sua vez, a resistência ou tolerância aos aleloquímicos depende muito da interação entre a espécie doadora e receptora do composto alelopático, além da concentração do mesmo no ambiente e sua interação com microorganismos e outros fatores ambientais que possam interagir, aumentando ou diminuindo o seu potencial aleloquímico (FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

O gênero *Trifolium* spp., tem despertado cada vez mais interesse na adubação verde, pois além de melhorar as características químicas, físicas e biológicas do solo, estudos recentes demonstram seu grande potencial como fonte de aleloquímicos (OHNO; DOOLAN, 2001).

Segundo Moraes et al. (2011), o aumento do nível de palhada de trevo vesiculoso causou redução do crescimento de milhã (*Digitaria* sp.) e de picão preto preto (*Bidens pilosa*). Por sua vez Liebman; Sundberg (2006), relatam que o trevo-vermelho (*Trifolium pratense*) diminui a germinação de diversas espécies e plantas daninhas. Em outro estudo do uso de leguminosas como espécie de cobertura, a

incorporação ao solo da biomassa de *Crotalaria spectabilis* reduziu o acréscimo de acúmulo de massa seca da parte aérea e das raízes das plântulas de *Lactuca sativa* e *Digitaria horizontalis* (ERASMO et al., 2011).

O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial alelopático dos trevos branco, vermelho e vesiculoso em diferentes concentrações de extratos e obtidos por maceração, infusão e alcoólico, sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de milhã.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Dois Vizinhos, localizada na latitude de 25° 44" Sul e longitude de 53° 04" Oeste, com altitude de 565 metros.

Foram utilizados para a preparação dos extratos, espécies de trevo branco (*Trifolium repens* L.), trevo vermelho (*Trifolium pratensis* L.) e trevo vesiculoso (*Trifolium vesiculosum*) os quais foram cultivados em condições de campo, semeados em canteiros de 50m². A densidade de semeadura utilizada foi de 5 kg/ha de sementes. O solo local é do tipo Latossolo Vermelho Distroférico Típico com terreno apresentando a declividade média em torno de 10%. Antes da semeadura, realizou-se o controle mecânico das plantas daninhas, e então realizou-se a semeadura a lanço seguido de incorporação das sementes ao solo com o auxílio de um rastel. Não foram realizadas adubações, irrigações e aplicação de defensivos durante o cultivo. Após 70 dias da semeadura, durante o estágio vegetativo, foi realizada a coleta da parte aérea das plantas de trevo para o preparo dos extratos.

A matéria fresca coletada foi encaminhada para o laboratório de sementes da UTFPR, Campus Dois vizinhos, onde foi desidratada em estufa com circulação de ar forçada, com temperatura de 40°C, evitando dessa forma a perda de possíveis compostos alelopáticos voláteis. Após a desidratação o material foi triturado em moinho de facas para diminuir o tamanho das partículas e aumentar a área de contato do material vegetal e o solvente. Para tal, foi utilizado uma peneira em aço inox com malha de 20 mesh, o que equivale a uma granulometria de 0,840 mm.

Os extratos foram preparados no laboratório de fitossanidade da UTFPR, Campus Dois vizinhos. Os métodos de obtenção dos extratos seguiram os pressupostos da ANVISA (2014).

Para obtenção do extrato por maceração, utilizou-se 50 g de pó de trevo que foi misturado a 450 mL de água fria destilada. Após agitação manual, foi mantido em repouso na ausência de luz por um período de 24 horas, posteriormente foi realizada a filtração em papel filtro com porosidade de 3 micras, separando assim a parte sólida da solução.

Para o extrato obtido por infusão foi utilizado 450 mL de água destilada a qual foi previamente aquecida até a temperatura de 100 °C, em seguida adicionou-se 50 g de pó de trevo deixando-se em repouso por 20 minutos em recipiente fechado. Na sequência, foi realizada a filtração em papel filtro com porosidade de 3 micras.

Para o extrato alcoólico, utilizou-se 50 g de pó de trevo imersos em 450 mL de álcool etílico 92,8%, e mantidos em repouso por 24 horas na ausência de luz, a temperatura de 25 °C. Após este período foi feita a filtração em papel filtro (porosidade de 3 micras), medindo-se o volume total da solução obtido após a filtração. Na sequência se removeu o etanol presente na solução por meio de evaporador rotativo. Posteriormente o resíduo da evaporação foi dissolvido em água destilada até completar o volume inicial da solução obtida após a filtração.

Após os extratos serem preparados na concentração de 10% peso/volume, estes foram diluídos em água destilada até a obtenção das concentrações de 2,5%; 5% e 7,5%.

Foram utilizadas sementes de milhã, coletadas de plantas presentes na área experimental da UTFPR Campus Dois Vizinhos. Após a coleta as sementes foram encaminhadas para o laboratório de sementes da mesma instituição, onde passaram por um processo de limpeza manual, para retirada de impurezas. Posteriormente foram armazenadas em sacos de papel kraft.

O teste empregado seguiu as Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009). A germinação das sementes foi realizada em gerbox, contendo duas folhas de papel mata-borrão as quais foram umedecidas com os extratos ou água destilada, conforme os tratamentos. A quantidade de solução utilizada foi determinada multiplicando duas vezes e meia o peso do papel. Em cada gerbox, foram dispostas 100 sementes de milhã. O teste de germinação foi instalado em câmara de

crescimento (BOD) com fotoperíodo de 12/12 h luz/escuro e temperatura de 25 ±1°C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial (3x3x4+testemunha), constituído de: fator A - espécies de trevo (trevo branco, trevo vermelho e trevo vesículoso); fator B - formas de extrato (maceração, infusão e alcoólico); fator C - concentrações (2,5; 5; 7,5 e 10% peso/volume) dos extratos vegetais, e testemunha com aplicação de água destilada.

Diariamente, durante 10 dias, foi realizada a contagem do número de sementes germinadas, para estabelecer o índice de velocidade de germinação (IVG), obtido através da fórmula descrita por Maguire (1962) e modificada por Wardle, Ahmed e Nicholson (1991): $VG=[N1/1+N2/2+N3/3+.....Nn/n]$, onde, N1, N2, N3 e Nn são o número de sementes germinadas e 1, 2, 3 e n são o número de dias após sementeira. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentaram a emissão da parte aérea e radícula.

Ao final do período (10 dias), foram avaliadas a germinação, o comprimento radicular (CR) e da parte aérea (CPA), após secagem em estufa (85°C) foi determinada a matéria seca do sistema radical (MSR) e matéria seca da parte aérea (MSPA) pela medida de 20 plântulas por unidade experimental (gerbox contendo as sementes).

Para amparar os resultados obtidos, foi realizada uma avaliação dos compostos presentes nos extratos vegetais por meio de espectroscopia de infravermelho. Uma amostra dos extratos vegetais (os mesmos utilizados nos testes de sementes) foi coletada e liofilizada para retirada da água presente nas amostras. Do pó obtido após a liofilização, foi utilizado 1 mg da amostra dos extratos e adicionado 100 mg de KBr (brometo de potássio), os quais foram macerados e posteriormente prensados para a formação da pastilha. Depois da pastilha estar formada, esta foi inserida no espectrômetro de infravermelho e realizado a leitura. A região espectral utilizada foi de 250 a 4.000 cm⁻¹.

Os resultados obtidos foram tabulados e submetidos à análise de variância pelo teste F e, quando houve significância estatística, foi procedido comparação entre médias, para os fatores espécies de trevo e tipo de extrato, utilizando-se o teste de Tukey (p≤0,05) e para o fator concentração dos extratos foi utilizada análise de regressão. Foi aplicado o teste de normalidade de Lilliefors, porém como

os dados foram significativos, não houve necessidade de transformação dos dados. Foi utilizado o programa ASSISTAT para realização das análises estatísticas.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as variáveis, germinação, IVG, MSR e MSPA, houve interação entre os fatores espécie de trevo, forma de extração e concentração do extrato aplicado.

O extrato alcóolico das plantas de trevo foi o mais eficiente na redução da germinação (média 67,4%) de sementes de milhã (tabela 10), da mesma maneira que os extratos a base de trevo vermelho, com redução média de 54,4%, seguido de trevo vesiculoso. Resultado semelhante foi obtido por Souza et al. (2002), onde a redução da germinação de sementes de *Brachiaria decumbens* Stapf., foi maior com a aplicação de extrato etanólico do que extrato aquoso de espécies vegetais.

Tabela 10. Germinação (%) de sementes de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculoso	
Testemunha	29 aA	29 aA	29 aA	29 a
Infusão	22 bAB	19 bB	24 bA	21 b
Maceração	20 bA	16 bB	16 cB	17 c
Alcóolico	15 cA	6 cB	7 dB	10 d
Média	21 A	17 C	19 B	
CV	33,55			

Medias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna, e maiúsculas na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O potencial diferenciado entre as formas de extração na redução da germinação está relacionado ao fato de que os princípios ativos vegetais são instáveis e não se distribuem de forma homogênea na planta, sendo que a forma de preparo, o método de aplicação e a concentração dos produtos, são fatores decisivos na obtenção de resultados (CRUZ et al. 2000).

O aumento da concentração dos extratos vegetais reduziu a porcentagem de germinação de milhã (figura 12), sendo que os extratos alcóolicos de trevo vermelho e vesiculoso inibiram completamente a germinação a partir da concentração de 5%. Porém mesmo em baixas concentrações os extratos demonstraram redução da germinação.

Aires (2007) observou que a elevação na concentração do extrato aquoso da parte aérea de *Qualea parviflora* diminuiu a germinação de sementes de *Digitaria horizontalis*. Resultado semelhante foi obtido por Liebman; Sundberg (2006), aonde a aplicação de extratos da parte aérea de trevo-vermelho (*Trifolium pratense*) diminuiu a germinação de diversas espécies invasoras.

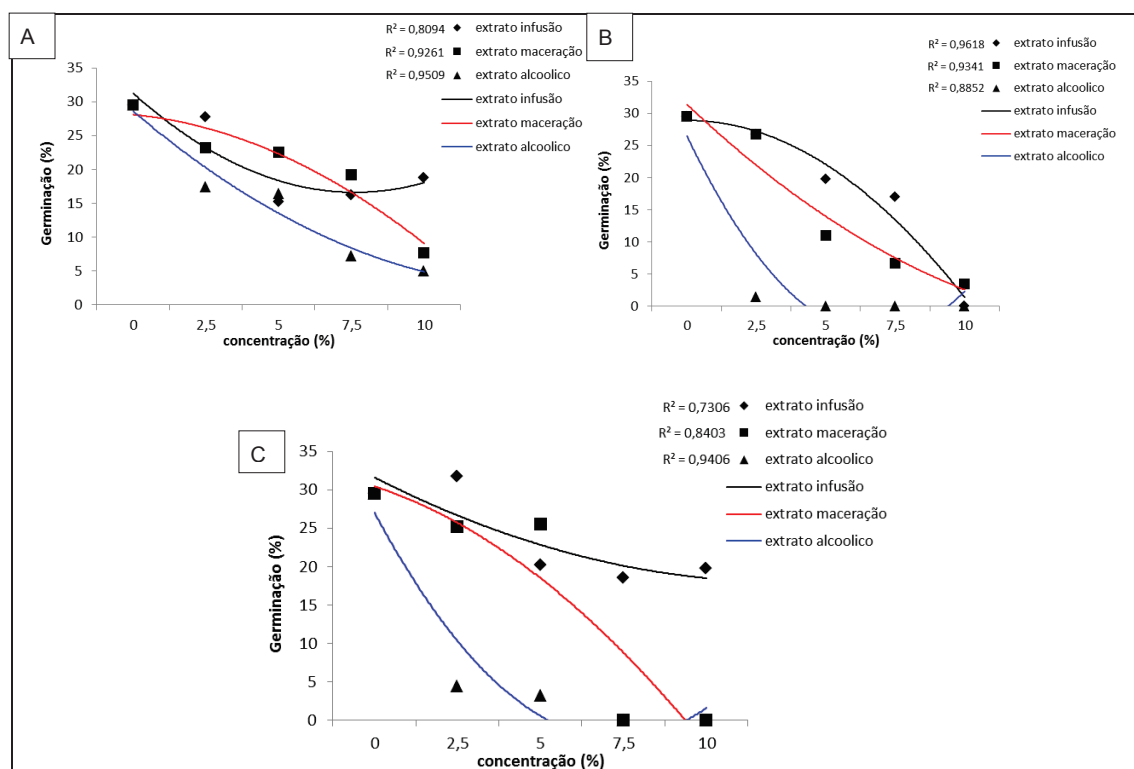


Figura 12. Germinação (%) de sementes de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso) UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

De acordo com Souza Filho (2002), em baixas concentrações, as substâncias alelopáticas podem não ser inibitórias para determinada espécie, por outro lado quando está em altas concentrações as substâncias são completamente inibitórias.

Esses resultados demonstram o potencial da utilização de espécies de trevo, para redução da população de plantas de milhã, sendo que o trevo vermelho foi mais expressivo na redução da germinação das sementes, seguido pelo trevo vesiculoso e branco respectivamente.

O índice de velocidade de germinação (IVG) sofreu interferência negativa, de forma mais expressiva, pelos extratos que utilizaram como solvente o álcool (Tabela 11), com redução média de 25,9%, tendo como base comparativa a testemunha.

Sendo que não houve diferença entre os extratos por infusão e maceração, exceto para o trevo vesiculoso, aonde o extrato por infusão apresentou menor influência no IVG, com redução de aproximadamente 6,7%.

Tabela 11. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			
	Branco	Vermelho	Vesiculoso	Média
Testemunha	5,79 aA	5,79 aA	5,79 aA	5,79 a
Infusão	3,36 bB	3,01 bB	5,40 bA	3,93 b
Maceração	3,53 bA	2,92 bA	3,34 cA	3,27 c
Alcólico	2,03 cA	1,18 cB	1,29 dB	1,50 d
Média	3,68 A	3,22 B	3,95 A	
CV	29,81			

Medias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O IVG apresentou correlação negativa com a concentração dos extratos aplicados nas sementes (Figura 13). Porém para o extrato por infusão de trevo vesiculoso a concentração de 2,5% apresentou os maiores valores de IVG, sendo que o aumento da concentração à partir desta resultou em diminuição desta variável.

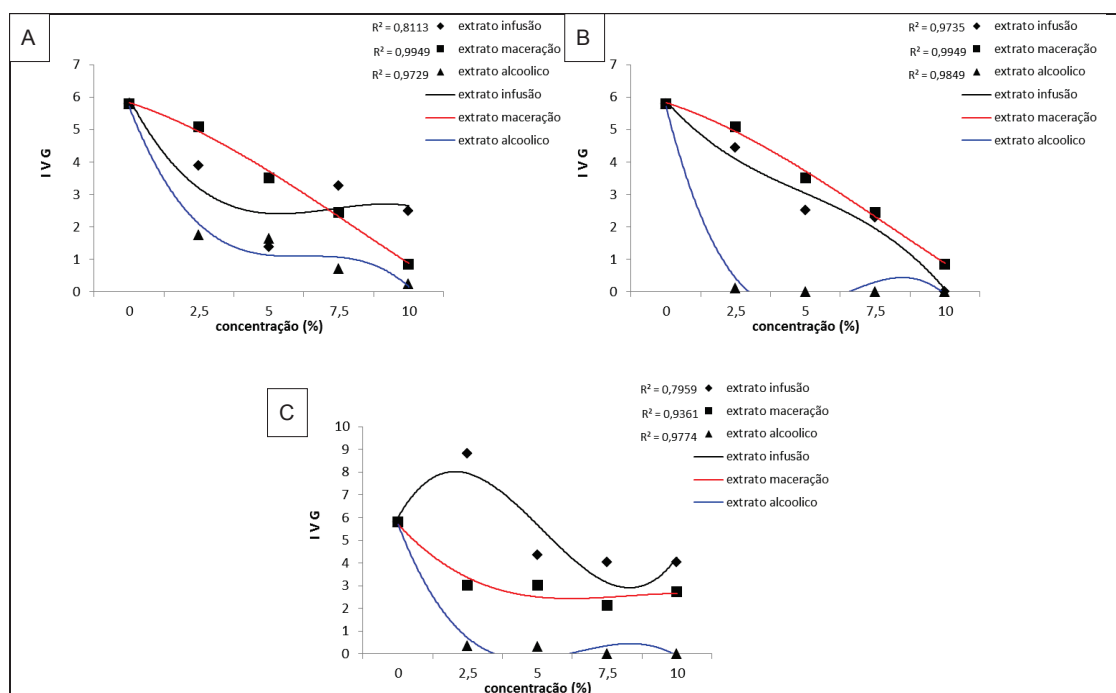


Figura 13. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso) UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Resultado semelhante foi obtido por Aires (2007), aonde o aumento da concentração do extrato aquoso da parte aérea de plantas de *Caryocar brasiliense*, *Qualea parviflora* e *Eugenia dysenterica* resultaram em redução do IVG de sementes de *Digitaria horizontalis*.

Por sua vez, Moraes et al., (2011) observaram que a palhada de trevo vesiculoso na superfície do solo ou incorporado, elevou o índice de velocidade de emergência (IVE) de *Digitaria* spp. O autor também observou que a utilização de 10 t ha⁻¹ de palhada de azevém na superfície do solo ou incorporado reduziu o IVE de *Digitaria* spp.

Essas alterações observadas no processo de germinação na presença de extratos vegetais normalmente são devido à presença de compostos fenólicos que causam inibição da síntese de ácido giberélico e ou atividade da enzima α -amilase, interferindo no sistema enzimático hidrolítico e de mobilização de reservas da semente (POLITYCKA; GMERK, 2008).

A redução de IVG de uma planta daninha é de suma importância para o controle integrado de plantas infestantes nas lavouras de grandes culturas, já que um atraso no desenvolvimento destas reduz o período crítico de interferência da planta daninha sobre uma cultura, com isso reduzindo a necessidade de aplicação de herbicidas nas lavouras, diminuindo assim os custos de produção.

A redução do IVG em plântulas de milhã pelo efeito alelopático, se torna uma boa alternativa para o controle de plantas daninhas, especialmente nas lavouras orgânicas, aonde não é permitido o uso de agroquímicos, nas áreas onde há relatos de resistência das plantas daninhas a um determinado mecanismo de ação de herbicidas, e também a utilização combinada do aleloquímico com os herbicidas, o que permite um uso mais racional dos agroquímicos.

O comprimento de raiz e parte aérea não apresentaram interação entre a forma de extração, espécie de trevo e concentração do extrato, porém apresentaram interação entre forma de extração e espécie de trevo.

Na Tabela 12 é demonstrada a interação entre espécie de trevo e tipo de extração para o fator comprimento de raiz (CR), sendo que os extratos alcóolicos de trevo vermelho e vesiculoso foram os que causaram as maiores reduções (74,8% e 70,2% respectivamente) no CR de plântulas de milhã, quando comparada a testemunha.

Tabela 12. Comprimento (cm) de raiz de plântulas de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculososo	
Testemunha	2,63 aA	2,63 aA	2,63 aA	2,63 a
Infusão	1,16 bAB	0,95 cB	1,43 bA	1,19 c
Maceração	1,57 bA	1,47 bA	1,43 bA	1,50 b
Alcólico	1,37 bA	0,66 cB	0,78 cB	0,94 d
Média	1,68 A	1,43 B	1,57 AB	
CV	46,16			

Medias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Como o observado na figura 14, de maneira geral, a aplicação do extrato de trevo reduziu o CR, havendo algumas oscilações entre as diferentes concentrações dos extratos.

A redução do comprimento de raiz também foi observada por Ohno; Doolan (2001), aonde o trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) reduziu o comprimento de raiz de plântulas de mostarda (*Sinapsis arvensis*) devido à presença de compostos fenólicos.

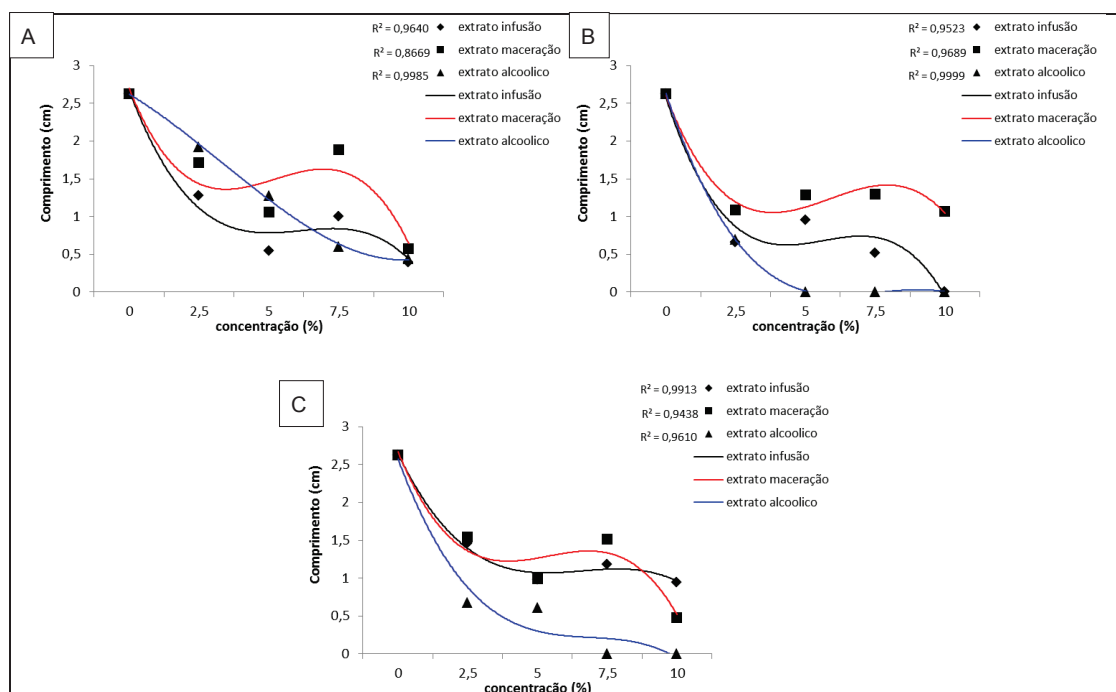


Figura 14. Comprimento (cm) de raiz de plântulas de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculososo) UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Possivelmente a pequena variação do CR entre as concentrações dos extratos, se deva a fato de que para este parâmetro a simples presença do composto alelopático seja mais importante do que a concentração deste no meio. O comprimento de radícula pode ser um parâmetro importante para observar a atividade alelopática de trevos sobre plantas.

É possível observar que as menores concentrações dos extratos não apresentaram tanto efeito sobre a germinação e IVG, como para CR, indicando que as alterações ocorridas no desenvolvimento da plântula, são as primeiras respostas ao efeito dos aleloquímicos presentes no meio.

Maraschin-Silva; Aqüila (2006) relatam que os aleloquímicos causam modificações no funcionamento de membranas, na absorção de nutrientes e de água, na atividade fotossintética e respiratória, entre outras. Segundo Ferrarese et al. (2000), os compostos fenólicos são potentes aleloquímicos que induzem o aumento da atividade de enzimas oxidativas, tendo consequência a modificação da permeabilidade da membrana e a formação de lignina, reduzindo o crescimento radicular.

Como pode ser observado na Tabela 13, as maiores reduções do comprimento da parte aérea (CPA) foi observado nos extratos alcoólicos de trevo vermelho e trevo vesiculoso, com reduções de aproximadamente 67,9% e 61,3% respectivamente.

Tabela 13. Comprimento (cm) de parte aérea de plântulas de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com de diferentes extratos de espécies de trevo. Dois Vizinhos, 2013.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculoso	
Testemunha	1,21 aA	1,21 aA	1,21 aA	1,21 a
Infusão	1,01 aAB	0,76 aB	1,26 aA	1,01 a
Maceração	1,27 aA	1,04 aA	1,12 aA	1,15 a
Alcoólico	1,07 aA	0,39 bB	0,47 bB	0,65 b
Média	1,14 A	0,85 B	1,01 A	
CV	42,74			

Medias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Assim como para o CR, o comprimento da parte aérea (CPA) também apresentou redução, com o aumento da concentração dos extratos (figura 15).

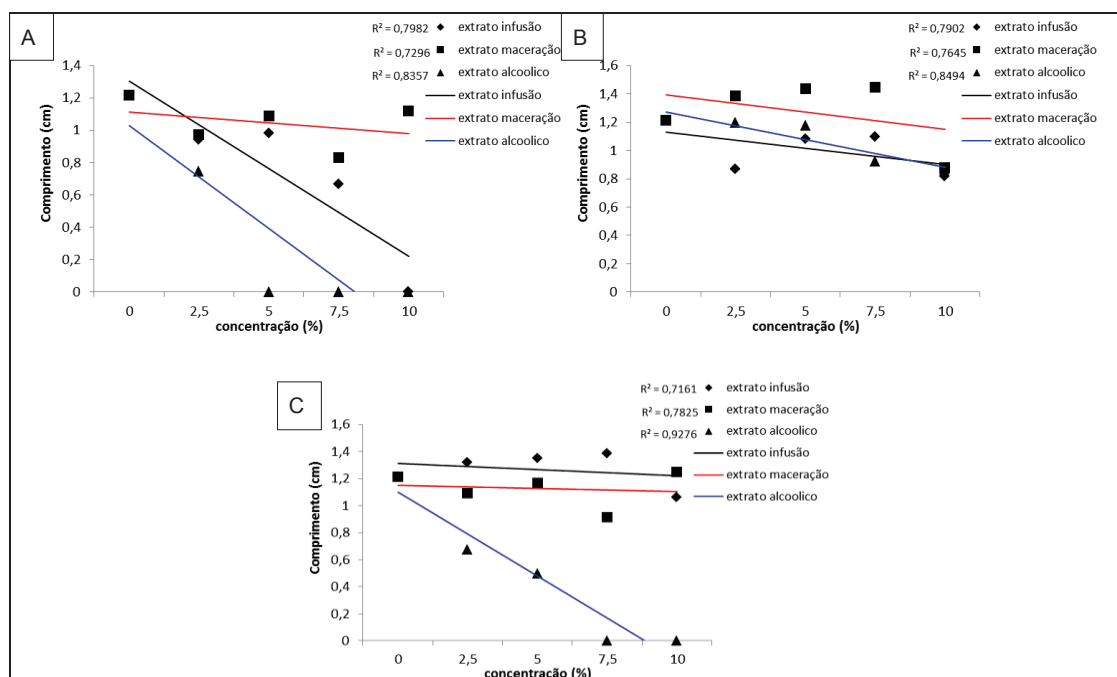


Figura 15. Comprimento (cm) de parte aérea de plântulas de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso) UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

O extrato alcóolico de trevo vermelho e vesiculoso e o extrato por infusão de trevo vermelho reduziram quase que completamente o CPA nas maiores concentrações.

No estudo da alelopatia, a redução do crescimento de plântula, muitas vezes é de maior importância, que a redução da germinação. Pois esta aumenta o potencial de competição de uma cultura sobre as plantas infestantes, devido a diminuição da interferência causada pela planta daninha, principalmente nos períodos iniciais de desenvolvimento, permitindo que a cultura se sobressaia apresentando dominância sobre a planta daninha (GOLDFARB et al., 2009).

Do ponto de vista ecológico, a redução do crescimento da plântula, é um mecanismo de seleção mais eficiente do que evitar a germinação da planta daninha, pois dessa forma ocorre a eliminação da descendência (PIRES, et al., 2001). É válido ressaltar que os extratos de trevo utilizados neste trabalho, mesmo sobre baixas concentrações, apresentaram efeito tanto sobre a germinação como sobre o crescimento de plântula.

Sabe-se que o crescimento da plântula é mais sensível aos aleloquímicos do que a germinação, já que os aleloquímicos atuam inicialmente na ligação das mem-

branas da planta receptora ou, penetrando nas células, provocando interferência no metabolismo (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Segundo Hoffmann et al., (2007), os aleloquímicos podem interferir nas divisões celulares, na formação do câmbio e dos vasos xilemáticos, afetando assim a partição de nutrientes pela plântula, resultando em alteração no alongamento da parte aérea, assim como das raízes.

Dentre as formas de preparação dos extratos, a utilização de álcool como solvente foi mais eficiente na redução da MSR, quando comparado com os outros métodos de extração utilizados neste trabalho, sendo que estes apresentaram redução média de 47,5% (Tabela 14). Dentre as espécies, o trevo vermelho resultou em maior supressão da MSR (redução média de 35,9%).

Tabela 14. Massa seca (mg) de raiz de plântulas de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculososo	
Testemunha	0,152 aA	0,152 aA	0,152 aA	0,152 a
Infusão	0,098 cB	0,095 bB	0,132 bA	0,108 b
Maceração	0,139 bA	0,148 aA	0,136 bA	0,141 a
Alcólico	0,112 cA	0,050 cC	0,078 cB	0,080 c
Média	0,125 A	0,111 B	0,124 A	
CV	17,89			

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em todos os extratos houve redução da massa seca de raiz (MSR) com o aumento da concentração, porém no extrato de trevo branco por infusão e maceração a redução da MSR na concentração de 10% foi menor do que a 5% (Figura 16).

É possível observar que o crescimento de plântula e o acúmulo de massa seca sofrem alterações de acordo com a concentração dos extratos, sendo assim possível constatar que o trevo branco, vermelho e vesiculososo possuem compostos, com efeito, alelopático sobre as sementes de milhã. Lembrando que o princípio da alelopatia consiste na liberação de uma aleloquímico por um organismo, que favoreça ou desfavoreça o desenvolvimento de outro organismo.

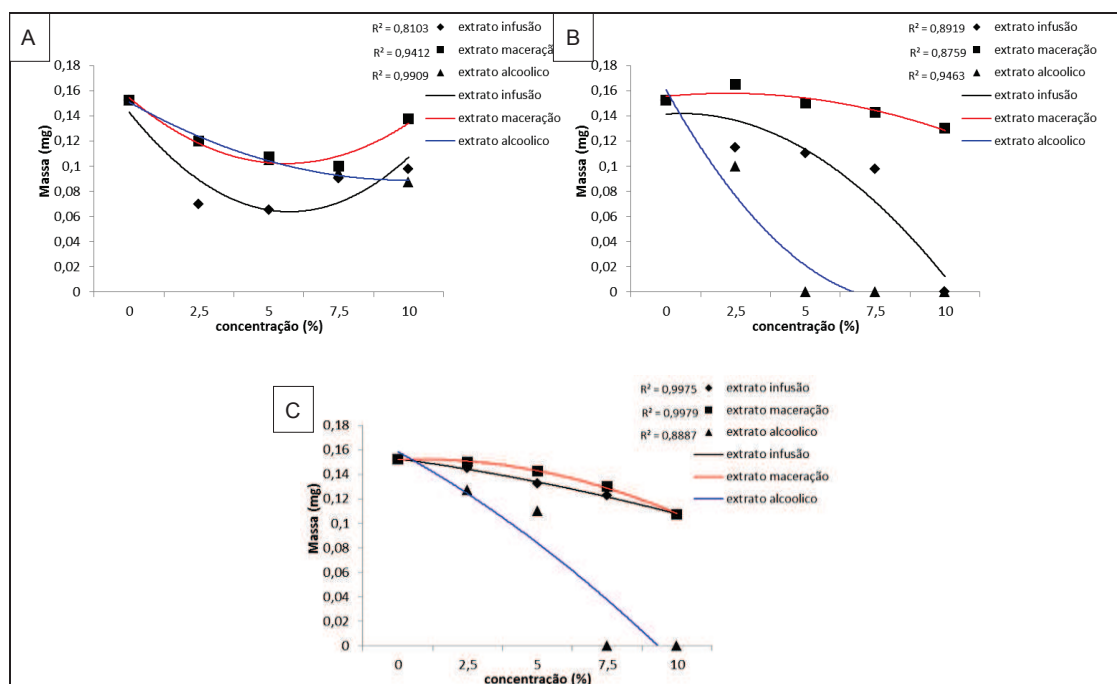


Figura 16. Massa seca (mg) de raiz de plântulas de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Dentre os extratos, o alcóolico de trevo vermelho foi o que apresentou maiores reduções da MSPA (67,3%) comparado com a testemunha, sendo que para as outras formas de extração não houve diferença significativa entre as espécies de trevo (Tabela 15).

Tabela 15. Massa seca (mg) da parte aérea de plântulas de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculoso	
Testemunha	0,152 aA	0,152 aA	0,152 aA	0,152 a
Infusão	0,159 aA	0,174 aA	0,156 aA	0,163 a
Maceração	0,141 abA	0,164 aA	0,145 aA	0,150 a
Alcóolico	0,127 bA	0,050 bC	0,076 bB	0,084 b
Média	0,145 A	0,135 AB	0,132 B	
CV	25,12			

Medias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na maioria dos extratos, a massa seca da parte aérea (MSPA) apresentou correlação negativa com a concentração dos extratos, exceto para o extrato por infusão de trevo vermelho, aonde a MSPA apresentou um comportamento quadrático, com os maiores valores nas concentrações intermediárias, como pode ser observa-

do na Figura 17. Em outro estudo utilizando milhã, Erasmo et al. (2011), observaram que a incorporação ao solo de *Crotalaria spectabilis* reduziu o acúmulo de matéria seca da parte aérea e de raiz de *Lactuca sativa* e *Digitaria horizontalis*.

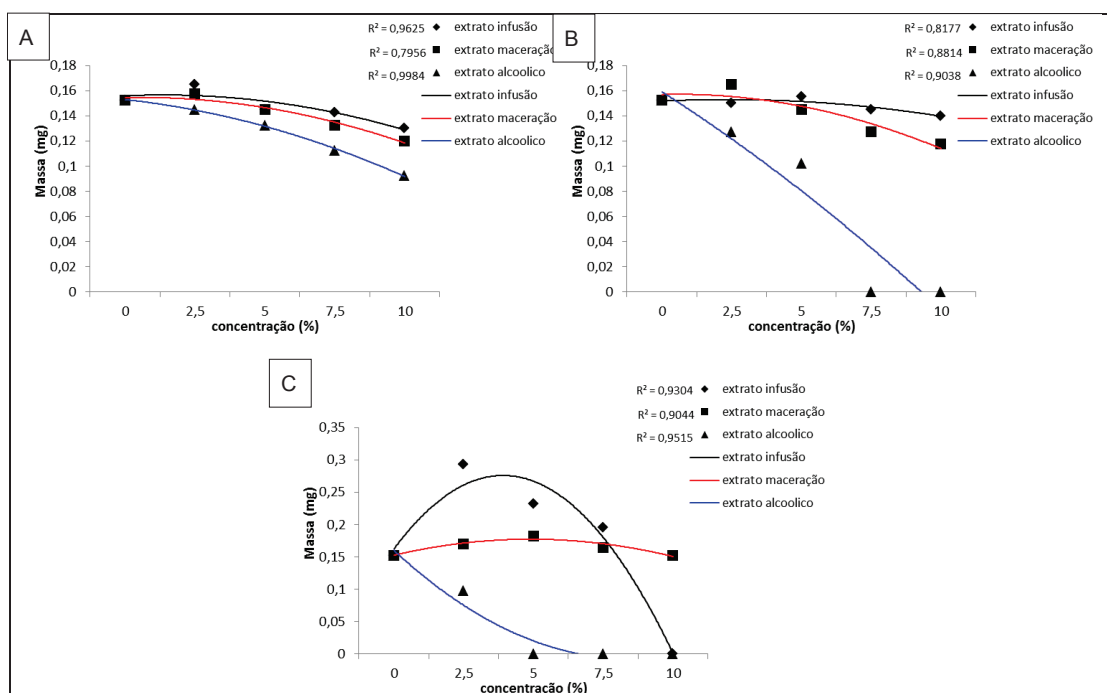


Figura 17. Massa seca (mg) da parte aérea de plântulas de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso) UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

As alterações observadas no crescimento de raiz e parte aérea, assim como a massa seca de raiz e parte aérea, são resultados de alterações primárias no metabolismo da planta devido ao estresse causado por um composto ainda não identificado dos extratos de trevo. De acordo com Ferreira; Áquila (2000), as modificações no padrão de desenvolvimento inicial e germinação podem ser resultados de inúmeros efeitos primários, como por exemplo, modificação na permeabilidade da membrana, respiração, conformação de enzimas e seus receptores, transcrição e tradução do DNA e ou no comportamento de mensageiros secundários.

As variações ocorridas no IVG, MSR e MSPA em relação à concentração dos extratos podem ser explicadas pela riqueza que compostos presentes no extrato bruto obtido pelos diferentes métodos de extração. Pois como não foi realizada a separação dos compostos presentes nos extratos, torna-se difícil a mensuração da quantidade de compostos presentes nos mesmo, assim como o efeito destes e possível interação entre eles.

Santos et al., (2002), observaram efeito de interação do compostos presentes no extrato bruto de casca de café, na qual a aplicação do extrato sobre sementes de caruru, aumentou o desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular devido ao N presente na molécula de cafeína, sendo este efeito mais expressivo do que o efeito negativo de um possível aleloquímico presente no extrato.

À partir dos espectros de infravermelho, obtidos dos diferentes extratos (Figura 18) é possível observar que pela intensidade de absorção, o extrato alcoólico foi o que mais possibilitou uma maior concentração de compostos, exceto para o trevo branco, aonde a extração por infusão apresentou maior concentração de compostos que o alcoólico.

Em relação aos grupos funcionais, observou-se que em todos os extratos há a presença do grupo funcional álcoois e fenóis, com absorção característica de duas bandas, sendo uma banda larga de O-H na região de $3.400-3.300\text{ cm}^{-1}$, outra banda C-O na região de $1.300-1.000\text{ cm}^{-1}$, há também a presença de anel aromático com absorção característica na faixa de $1.600-1.450\text{ cm}^{-1}$.

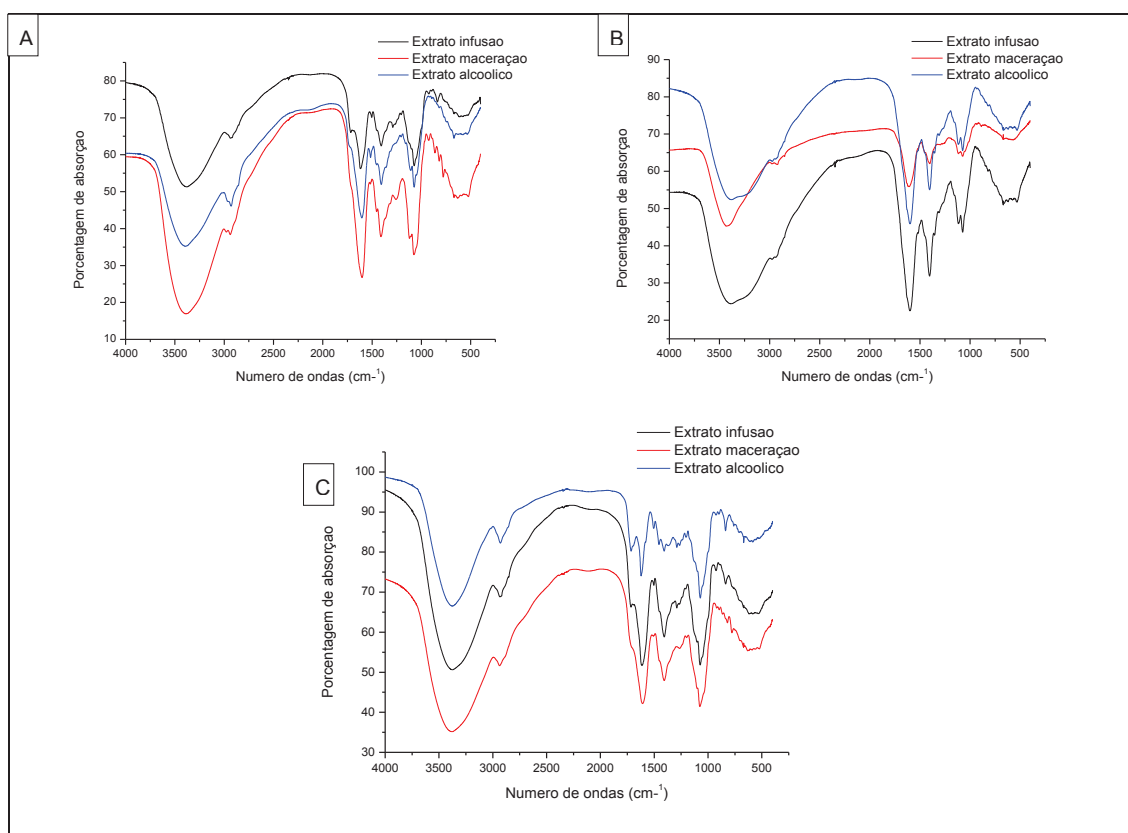


Figura 18. Espectro infravermelho dos extratos de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso). UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Com base nestes grupos funcionais é possível confirmar a presença de compostos fenólicos em todos os extratos de trevo, pois estes são basicamente formados por um grupo hidroxila e um anel aromático, sendo estes os principais componentes de substâncias alelopáticas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Em relação aos processos de extração é possível afirmar que o extrato alcoólico foi mais eficiente na extração de compostos orgânicos da matéria seca de trevo, seguido do extrato por infusão e maceração respectivamente, exceto para a espécie de trevo branco, aonde a extração por infusão se sobressaiu aos demais processos de extração. Essa observação é baseada na quantidade de picos presentes no espectro.

Em relação às espécies de trevo, observou-se que para os extratos maceração e infusão, não houve diferença no espectro obtido a partir de trevo branco e vesiculoso, porém o espectro obtido a partir de trevo vermelho foi diferente em relação às outras espécies de trevo.

Por sua vez os espectros obtidos dos extratos alcoólicos foram diferentes entre as três espécies de trevo, demonstrando que etanol é mais eficiente na extração de compostos do que a água. Esse fato pode estar relacionado com a polaridade da molécula de etanol, a qual possui uma extremidade polar e outra apolar, diluindo assim tanto substâncias polares como apolares. Por sua vez, a molécula de água é considerada polar, ou seja, dilui apenas substâncias polares (MOREIRA et al., 2010).

Segundo Taiz; Zeiger (2013) os compostos fenólicos vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos, sendo alguns solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são solúveis em água e outros que são praticamente insolúveis, o que explica o melhor resultado apresentado para o extrato alcóolico dos trevos sobre a planta daninha.

Em relação aos métodos de infusão e maceração, pode-se dizer que a maior temperatura utilizada na infusão (100°C) tenha favorecido a diluição dos compostos na água. Segundo Watanabe et al. (2006), as temperaturas mais altas frequentemente favorecem a solubilidade do soluto no solvente.

Dentre os compostos fenólicos que podem ser encontrados nos trevos, Taiz; Zeiger (2013) relatam a presença dos isoflavonóides, que possuem várias atividades biológicas destacando atividades antifúngicas e antibacterianas (fitoalexinas), atividade estrogênica e propriedades inseticidas.

Os extratos alcoólicos dos trevos foram mais eficientes na redução da germinação e desenvolvimento inicial das sementes, por apresentar uma maior quantidade de compostos extraídos. Resultado semelhante foi obtido por Oliveira et al., (2002), aonde o extrato alcoólico de jatobá do cerrado apresentou maior efeito alelopático sobre sementes de alface que o extrato aquoso. Segundo este mesmo autor esse efeito provavelmente esteja relacionado à maior capacidade do solvente orgânico de retirar do material vegetal, maiores quantidades e ou substâncias inibidoras específicas.

O trevo vermelho apresentou maior potencial alelopático sobre as sementes de milhã, do que o trevo branco e vesiculoso, possivelmente se deva há algum composto em específico presente nos extratos de trevo vermelho, o qual pode ser confirmando analisando os infravermelhos dos extratos (figura 18), pois realizando a sobreposição das absorções obtidas entre os métodos de extração, observou-se, que em todas as formas de extração, o trevo vermelho apresentou absorbância diferente do trevo branco e vesiculoso, ao quais foram similares nas extrações por maceração e infusão.

Os resultados demonstram o potencial alelopático dos extratos de trevo sobre a milhã. Nesse sentido, os dados sugerem novos trabalhos que busquem avaliar se esse efeito ocorrido em laboratório acontecerá em condições de campo, já que a combinação com o ambiente pode alterar o efeito de um aleloquímico, pela presença principalmente de microorganismos do solo.

3.6 CONCLUSÕES

O trevo branco, trevo vermelho e trevo vesiculoso nas diferentes formas de extração apresentam efeito alelopático sobre sementes e plântulas de milhã, com destaque para o extrato alcoólico de trevo vermelho.

Os principais compostos identificados nos espectros dos extratos de trevo foram os compostos fenólicos, sendo estes sugeridos como responsáveis pelo efeito alelopático.

Os efeitos alelopáticos verificados variaram, em função da forma de extração, bem como das concentrações.

REFERÊNCIAS

AIRES, Stefano.S. **Potencial alelopático de espécies nativas do cerrado na germinação e desenvolvimento inicial de invasoras**. Dissertação (mestrado) Universidade de Brasília, Instituto de ciências biológicas, Departamento de botânica, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC nº 10, de 9 de Março de 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html>. Acessado em: 27/março/2014.

ALVES, Maria. da. C. S; MEDEIROS FILHO, Sebastião; INNECCO, Renato; TORRES, Salvador. B. Alelopátia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Regra para análise de sementes**. Brasília, 1º edição, p. 399, 2009.

CRUZ, S. E. M.; NOZAKI, M. H.; BATISTA, M. A. Plantas medicinais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.15, p.28-34, 2000.

ERASMO, Eduardo.A.L; AZEVEDO, Waldeon.R.de; COSTA, Neumárcio.V.da; ALVES, Pedro.L.da.C.A. Efeito de extratos de adubos verdes sobre *Lactuca sativa* e *Digitaria horizontalis*. **Bragantia**, Campinas, v.70, n.3, p.529-537, 2011.

FERRARESE, M.L.L; SOUZA, N.E; FERRARESE FILHO, M.L.L. Ferulic acid uptake by soybean root in nutriente culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.22, p.121-124, 2000.

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

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p.323, 2004.

FERREIRA, M.C.; SOUZA, J.R.P. de; FARIA, T.J. Potenciação alelopática de extratos vegetais na germinação e no crescimento inicial de picão preto-preto e alface. **Ciência Agrotécnica**, v.31, n.4, p.1054-1060, 2007.

GOLDFARB, Míriam; PIMENTEL, Livia.W; PIMENTEL, Nara.W. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v.3, n.1, p.23-28, 2009.

HOFFMANN, Clairomar.E.F; NEVES, Luiz.A.S.das; BASTOS, Cristiane.F; WALLAU, Gabriel.da.L. Atividade alelopática de *Nerium Oleander* L. e *Dief enbachia picta schott* em sementes de *Lactuca Sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.6, n.1, p.11-21, 2007.

LIEBMAN, M.; SUNDBERG, D.N. Seed mass affects the susceptibility of weed and crop species to phytotoxins extracted from red clover shoots. **Weed Science**, v.54, n.2, p.340-345, 2006.

MARASCHIN-SILVA, Fabiana; AQUILA, Maria.E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta bot. Bras**, v.20, n.1, p.61-69, 2006.

MORAES, Pedro. V. D. de; AGOSTINETTO, Dirceu; PANOZZO, Luis. E; OLIVEIRA, Claudia; SILVA, Jose.M.B.V.da; SILVA, Diecson.R.O.da. Manejo de culturas de cobertura com potencial alelopático sobre o crescimento inicial de *Digitaria* spp. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.6, n.2, p.300-308, 2011.

MORAES, P.V.D; AGOSTINETTO, D; PANOZZO, L.E; TIRONI, S.P; GALON, L; SANTOS, L.S. Alelopatia de plantas de cobertura na superfície ou Incorporadas ao solo no controle de *Digitaria* spp. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.29, p.963-973, 2011.

MOREIRA, Leonardo. M; RODRIGUES, Máira. R; OLIVEIRA, Heuder. P. M. de; LIMA, Adriana; SOARES, Rafael. R. S; BATISTELA, Vagner. R; GEROLA, Adriana. P; HIOKA, Noboru. Influência de diferentes sistemas de solventes água-etanol sobre as propriedades físico-químicas e espectroscópicas dos compostos macrocíclicos feofitina e clorofila. **Quim. Nova**, v.33, n.2, p.258-262, 2010.

OHNO, T.; DOOLAN, K.L. Effects of red clover decomposition on phytotoxicity of wild mustard seedling growth. **Applied Soil Ecology**, v.16, n.2, p.187-192, 2001.

OLIVEIRA, Maria.N. S.; MERCADANTE, Maria.O. LOPES, Paulo. S. N.; GOMES, Inês. A. C.GUSMÃO, Eduardo; RIBEIRO, Leonardo. M. Efeitos alelopáticos dos extratos aquoso e etanólico de jatobá do cerrado. **Unimontes Científica**. Montes Claros, v.4, n.2, 2002.

PIRES, Nádja. de. M; PRATES, Hélio. T; PEREIRA FILHO, Israel. A; OLIVEIRA Jr, Rubem. S. de; FARIA, Trícia. C. L. de. Atividade alelopática da leucena sobre espécies de plantas daninhas. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, p.61-65, 2001.

POLITYCKA, B; GMERK, J. Effect of ferulic and p-coumaric acidson the scitivity of hydrolytic enzymes and growth of radicals in germinating seeds of cucumber and pea. **Allelopathy J.** v.21, p.227-238, 2008.

SANTOS, Julio. C. F; SOUZA, Itamar. F. de; MENDES, Antônio. N. G. M; MORAIS, Augusto. R. de; CONCEIÇÃO, Heráclito. E. O. da; MARINHO, José. T. S. Efeito de extratos de cascas de café e de arroz na emergência e no crescimento do caruru-de-mancha. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v.37, n.6, p.783-790, 2002.

SOUZA, José.R.P.de; VIDAL, Luis,H,I; VIANI, Ricardo.A.G. Ação de extratos aquoso e etanólico de espécies vegetais na germinação de sementes de *Brachiaria decumbens* Stapf. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.23, n.2, p.197-202, 2002.

SOUZA FILHO, A.P.S. Atividade potencialmente alelopática de extratos brutos e hidroalcoólicos de feijão-de-porco (*canavalia ensiformis*). **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.20, n.3, p.357-364, 2002.

TAIZ, Lincon; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia vegetal**; Tradução: DIVAN JUNIOR et al., 5o ed., Porto Alegre: Artmed, p.918, 2013.

TEIXEIRA, Cícero. M; ARAÚJO, João. B. S; CARVALHO, Gabriel. J. de. Potencial alelopatico de plantas de cobertura no controle de picão preto-preto (*Bidens pilosa* L.). **Ciência agrotecnica**, Lavras, v.28, n.3, p.691-695, 2004.

WARDLE, A.D. AHMED, M.; NICHOLSON, K.S., Allelopathic influence of nodding thistle (*Carduns nutans* L.) seed on germination and radicle growth of pasture plants. **Journal Agriculture Research**, New Zealand, v.34, n.2, p.185-191, 1991.

WATANABE, C.B; NOSSE, T.M; GARCIA, C.A; PINHEIRO, N.P. Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v.8, n.4, p.76-86, 2006.

4 CAPÍTULO III - ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE ESPÉCIES DE TREVOS SOBRE SEMENTES DE *Bidens* sp.

4.1 RESUMO

A rotação de culturas altera a população de plantas daninhas predominantes no meio, seja por meio de diferentes níveis de competição e ou por diferentes aleloquímicos liberados no meio. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial alelopático de trevos em diferentes concentrações de extratos e obtidos de diferentes formas, sobre a germinação, o desenvolvimento inicial de sementes e plântulas de picão preto. Avaliou-se em esquema fatorial 3 x 3 x 5, os extratos obtidos por infusão, maceração e alcoólico das espécies de trevo branco, trevo vermelho e trevo vesiculoso, em quatro concentrações (2,5; 5,0; 7,5 e 10 %) e testemunha (água destilada), respectivamente. Foram semeadas 100 sementes em rolo de papel germiteste, constituindo a unidade experimental, em quatro repetições, os quais foram umedecidos com os diferentes extratos e ou água destilada, de acordo com os tratamentos. O teste de germinação foi instalado em câmara de crescimento (BOD) com fotoperíodo de 12/12 h luz/escuro e temperatura de 25 ±1°C. As avaliações de germinação foram realizadas diariamente e no final do experimento com 10 dias, foi mensurado o índice de velocidade de germinação (IVG) e o comprimento de raiz (CR) e parte aérea (CPA), massa seca de raiz (MSR) e parte aérea (MSPA). Para amparar os resultados obtidos, também foi realizado o espectro de infravermelho dos extratos. Observou-se que todos os extratos apresentaram efeito sobre as sementes de picão preto, causando redução da germinação, IVG, CR, CPA, MSR, MSPA. As espécies de trevos branco, vermelho e vesiculoso nas diferentes formas de extração apresentam efeito alelopático em sementes e plântulas de picão preto, com destaque para o extrato alcoólico de trevo vermelho. Analisando os espectros foi possível observar a presença de compostos fenólicos em todos os extratos. Os efeitos alelopáticos verificados variaram, em função da forma de extração, bem como das concentrações.

Palavras-chave: Asteraceae, Isoflavonóides, Metabólitos secundários, *Trifolium* sp., Picão-preto.

4.2 ABSTRACT

Crop rotation changes the population of the prevalent weeds means, through different levels or different and competition allelochemicals released into the medium. The objective of this study was to evaluate the allelopathic potential of shamrocks in different concentrations of extracts obtained in different ways, on germination, early development of seeds and seedlings pick. Was evaluated in a factorial 3 x 3 x 5, the extracts obtained by infusion, maceration and alcoholic species of white clover, red clover and vesiculosum clover at four concentrations (2.5, 5.0, 7.5 and 10 %) and control (distilled water), respectively. 100 seeds were sown in germitest paper roll, forming an experimental unit in four replicates, which were wetted with the different extracts or distilled water in accordance with the treatments. The germination test was carried out in a growth chamber (BOD) with a photoperiod of 12/12 h light / dark and temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Germination evaluations were performed daily, and at the end of the experiment 10 days, measured the germination speed index (GSI) and root length (RL) and shoot (SL), root dry weight (RDW) and (SDW). To support the results obtained, the infrared spectrum of the extracts was also performed. It was observed that all the extracts showed effect on seed pick causing reduced germination, GSI , RL , SL , RDW , SDW . The species of white, red and vesiculosum clovers in different forms of extraction have allelopathic effects on seeds and seedlings of pick, especially the alcoholic extract of red clover. Analyzing the spectra we could observe the presence of phenolic compounds in all extracts. The allelopathic effects seen varied, depending on the form of extraction and the merger.

Keywords: Asteraceae, Isoflavones, Secondary Metabolites, *Trifolium* sp., Pick.

4.3 INTRODUÇÃO

O gênero *Bidens* sp., popularmente conhecido como picão preto, apresenta grande incidência na América do Sul, sendo que no Brasil está presente em quase todo o território (FERREIRA et al., 2007). Estes autores relatam que as maiores incidências são observadas nas áreas agrícolas das regiões centro-oeste e sul, sendo

uma das principais plantas daninhas das culturas anuais e perenes, aonde as maiores incidências são observadas nas estações quentes. Entretanto Ferreira et al., (2007) afirmam que esta planta pode ser encontrada durante todo o ano nas lavouras, destacando-se por ser uma planta daninha agressiva, pois além de estabelecer competição com a culturas pode servir como hospedeira de doenças e pragas, causando grandes perdas na produção agrícola (FERREIRA et al., 2007).

O controle de picão preto e outras plantas daninhas, com a utilização de espécies de cobertura com potencial alelopático tem se tornado uma alternativa viável em sistemas agrícolas, compondo assim o sistema de rotação de culturas (CORSA-TO et al., 2010), já que o efeito alelopático pode ocorrer tanto durante o ciclo de cultivo quanto nos cultivos subsequentes (NÓBREGA et al., 2009).

O rodízio de culturas exerce grande influencia no controle de pragas, doenças e plantas daninhas nas lavouras de grandes culturas, por meio da competição e ou alelopatia, amortizando a necessidade de aplicação de agrotóxicos utilizados além de minimizar os impactos ambientais oriundos das práticas agrícolas (CARVALHO, 2006). A diversificação de culturas exploradas em uma mesma área altera a intensidade de competição e efeitos alelopáticos a que a plantas daninhas são submetidas, permitindo assim uma diversificação dos métodos de controle (SOUZA FILHO, 2002).

Por sua vez, o princípio básico da alelopatia, é determinado como sendo qualquer efeito direto ou indireto, seja ele prejudicial ou benéfico, de uma planta e ou microorganismo sobre outro, causado pela liberação de compostos químicos ao ambiente, conhecidos como aleloquímicos (FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

Mazzafera (2003) destaca que os compostos alelopáticos em sua maioria tem origem no metabolismo secundário das plantas, sendo a maior parte compostos fenólicos. Segundo Taiz; Zeiger (2013) as plantas de trevo apresentam dentre outras substâncias a classe de compostos do grupo dos flavonóides, os quais, segundo Verdi et al.,(2005) apresentam expressiva atividade biológica e ação alelopática.

Em estudo com plantas daninhas, Moraes et al. (2012), destacam a utilização do trevo vesiculoso (*Trifolium vesiculosum*) como fonte de compostos alelopáticos, pois observaram que o extrato aquoso causou alteração no desenvolvimento inicial e redução da germinação de sementes de picão preto.

Estudando outra fonte de aleloquímicos, Corsato et al. (2010), observaram que a aplicação de extrato aquoso de folhas de girassol (*Helianthus annuus*) na con-

centração de 40% inibiu completamente a germinação de sementes de picão preto. Por sua vez Teixeira et al. (2004), constataram que a aplicação de extrato aquoso da parte aérea de *Crotalaria juncea* e mucuna-preta (*Mucuna aterrima*), reduziram, respectivamente a germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes picão preto.

O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial alelopático de trevos em diferentes concentrações de extratos e obtidos de diferentes formas, sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de sementes e plântulas de picão preto.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Dois Vizinhos, localizada na latitude de 25° 44" Sul e longitude de 53° 04" Oeste, com altitude de 565 metros.

Foram utilizados para a preparação dos extratos, espécies de trevo branco (*Trifolium repens* L.), trevo vermelho (*Trifolium pratensis* L.) e trevo vesiculoso (*Trifolium vesiculosum*) os quais foram cultivados em condições de campo, semeados em canteiros de 50m². A densidade de semeadura utilizada foi de 5 kg/ha de sementes. O solo local é do tipo Latossolo Vermelho Distroférico Típico com terreno apresentando a declividade média em torno de 10%. Antes da semeadura, realizou-se o controle mecânico das plantas daninhas e então realizou-se a semeadura a lanço seguido de incorporação das sementes ao solo com o auxílio de um rastel. Não foram realizadas adubações, irrigações e aplicação de defensivos durante o cultivo. Após 70 dias da semeadura, durante o estágio vegetativo, foi realizada a coleta da parte aérea das plantas de trevo para o preparo dos extratos.

A matéria fresca coletada foi encaminhada para o laboratório de sementes da UTFPR, Câmpus Dois vizinhos, onde foi desidratada em estufa com circulação de ar forçada, com temperatura de 40°C, evitando dessa forma a perda de possíveis compostos alelopáticos voláteis. Após a desidratação o material foi triturado em moinho de facas para diminuir o tamanho das partículas e aumentar a área de contato do material vegetal e o solvente. Para tal, foi utilizado uma peneira em aço inox com malha de 20 mesh, o que equivale a uma granulometria de 0,840 mm.

Os extratos foram preparados no laboratório de fitossanidade da UTFPR, Campus Dois vizinhos. Os métodos de obtenção dos extratos seguiram os pressupostos da ANVISA (2014).

Para obtenção do extrato por maceração, utilizou-se 50 g de pó de trevo que foi misturado a 450 mL de água fria destilada. Após agitação manual, foi mantido em repouso na ausência de luz por um período de 24 horas, posteriormente foi realizada a filtragem em papel filtro com porosidade de 3 micras, separando assim a parte sólida da solução.

Para o extrato obtido por infusão foi utilizado 450 mL de água destilada a qual foi previamente aquecida até a temperatura de 100 °C, em seguida adicionou-se 50 g de pó de trevo deixando-se em repouso por 20 minutos em recipiente fechado. Na sequência, foi realizada a filtragem em papel filtro com porosidade de 3 micras.

Para o extrato alcoólico, utilizou-se 50 g de pó de trevo imersos em 450 mL de álcool etílico 92,8%, e mantidos em repouso por 24 horas na ausência de luz, a temperatura de 25 °C. Após este período foi feita a filtragem em papel filtro (porosidade de 3 micras), medindo-se o volume total da solução obtido após a filtragem. Na sequência se removeu o etanol presente na solução por meio de evaporador rotativo. Posteriormente o resíduo da evaporação foi dissolvido em água destilada até completar o volume inicial da solução obtida após a filtragem.

Após os extratos serem preparados na concentração de 10% peso/volume, estes foram diluídos em água destilada até a obtenção das concentrações de 2,5%; 5% e 7,5%.

Foram utilizadas sementes de picão-preto, coletadas de plantas presentes na área experimental da UTFPR Campus Dois Vizinhos. Após a coleta as sementes foram encaminhadas para o laboratório de sementes da mesma instituição, onde passaram por um processo de limpeza manual, para retirada de impurezas. Posteriormente foram armazenadas em sacos de papel kraft.

O teste empregado seguiu as Regras para Análises de Sementes de picão preto (BRASIL, 2009). A germinação das sementes foi realizada em rolos de papel germitest sobre duas folhas de papel os quais foram umedecidos com os extratos ou água destilada, conforme os tratamentos. A quantidade de solução utilizada foi determinada multiplicando duas vezes e meia o peso do papel. Em cada rolo, foram dispostas 100 sementes de picão preto. O teste de germinação foi instalado em câ-

mara de crescimento (BOD) com fotoperíodo de 12/12 h luz/escuro e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial ($3 \times 3 \times 4 +$ testemunha), constituído de: fator A - espécies de trevo (trevo branco, trevo vermelho e trevo vesículoso); fator B - formas de extrato (maceração, infusão e alcoólico); fator C - concentrações (2,5; 5; 7,5 e 10% peso/volume) dos extratos vegetais e testemunha com aplicação de água destilada.

Diariamente, durante 10 dias, foi realizada a contagem do número de sementes germinadas, para estabelecer o índice de velocidade de germinação (IVG), obtido através da fórmula descrita por Maguire (1962) e modificada por Wardle, Ahmed e Nicholson (1991): $VG = [N1/1 + N2/2 + N3/3 + \dots + Nn/n]$, onde, N1, N2, N3 e Nn são o número de sementes germinadas e 1, 2, 3 e n são o número de dias após sementeira. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentaram a emissão da parte aérea e radícula.

Ao final do período (10 dias), foram avaliadas a germinação, o comprimento radicular (CR) e da parte aérea (CPA), após secagem em estufa (85°C) foi determinada a matéria seca do sistema radical (MSR) e matéria seca da parte aérea (MSPA) pela medida de 20 plântulas por unidade experimental (cada rolo contendo as sementes).

Para amparar os resultados obtidos, foi realizada uma avaliação dos compostos presentes nos extratos vegetais por meio de espectroscopia de infravermelho. Sendo que uma amostra dos extratos vegetais (os mesmos utilizados nos testes de sementes) foi coletada e liofilizada para retirada da água presente na amostra. Do pó obtido após a liofilização, foi utilizado 1 mg da amostra dos extratos e adicionado 100 mg de KBr (brometo de potássio), os quais foram macerados e posteriormente prensados para a formação da pastilha. Depois de a pastilha estar formada, esta foi inserida no espectrômetro de infravermelho e realizado a leitura. A região espectral utilizada foi de 250 a 4.000 cm^{-1} .

Os resultados obtidos foram tabulados e submetidos à análise de variância pelo teste F e, quando houve significância estatística, foi procedido comparação entre médias, para os fatores espécies de trevo e tipo de extrato, utilizando-se o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e para o fator concentração dos extratos foi utilizada análise de regressão. Foi aplicado o teste de normalidade de Lilliefors, porém como os da-

dos foram significativos, não houve necessidade de transformação dos dados. Foi utilizado o programa ASSISTAT para realização das análises estatísticas.

4.5 RESULTADO E DISCUSSÃO

Para as variáveis, germinação, CR, CPA e MSR, houve interação entre os fatores espécie de trevo, forma de extração e concentração do extrato aplicado.

De acordo com os dados obtidos na Tabela 16, é possível observar que a germinação das sementes de picão preto foi mais afetada pelo extrato de trevo vermelho com redução média de 72,6%, sendo que este foi mais danoso quando combinado com a extração alcóolica, a qual apresentou redução média de aproximadamente 78,7% na germinação das sementes.

Tabela 16. Germinação (%) de sementes de picão preto (*Bidens* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculososo	
Testemunha	62 aA	62 aA	62 aA	62 a
Infusão	25 bA	18 bB	21 bA	21 b
Maceração	23 bA	23 bB	25 bA	24 b
Alcólico	17 bA	13 bB	17 bA	15 c
Média	32 A	29 B	31 A	
CV	28,28			

Medias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Dentre as formas de extração a que causou maior redução da germinação das sementes de picão preto, para ambas as espécies de trevo, foi o extrato alcóolico, com redução média de aproximadamente 76,5% quando comparado com a testemunha.

Como pode ser observado na Figura 19, o aumento da concentração dos extratos, indiferente da forma de extração, resultou em uma redução da germinação das sementes de picão preto.

O extrato alcóolico de trevo vermelho inibiu a germinação das sementes de picão preto à partir da concentração de 2,5%, já para o extrato alcóolico de trevo branco e vesiculososo este resultado só foi observado à partir da concentração de 5%. Resultado semelhante foi observado por Corsato et al. (2010), o qual observou que

a aplicação de extrato aquoso de folhas de girassol em baixas concentrações podem inibir completamente a germinação de sementes de picão preto. Borella; Pastorini (2009) também observaram que extratos aquosos de folhas de umbu (*Phytolacca dioica* L.) reduziram a porcentagem de germinação de sementes de picão-preto, sendo que a concentração de 8% foi completamente inibitória.

Esses resultados demonstram que a extração por etanol foi mais eficiente na remoção de compostos com potencial alelopático das plantas de trevo, pois estes extratos apresentaram maior efeito na inibição da germinação das sementes de picão preto.

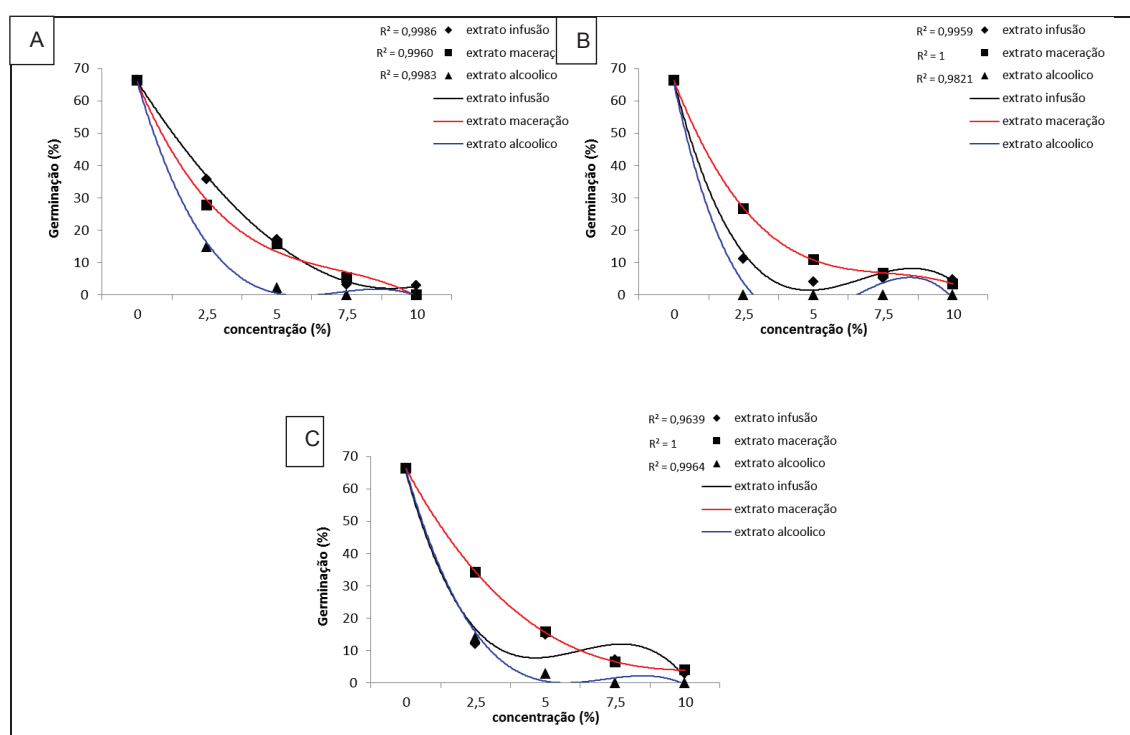


Figura 19. Germinação (%) de sementes de picão preto (*Bidens* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso), UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

A diferença na germinação de sementes de picão preto entre os métodos de extração confirma os pressupostos de Cruz et al. (2000), o quais citam que a forma de preparo, o método de aplicação e a concentração dos produtos, são fatores decisivos na obtenção de resultados, pois os princípios ativos vegetais são instáveis e não se distribuem de forma homogênea na planta.

Para a variável, índice de velocidade germinação (IVG) não houve interação entre os três fatores, porém houve interação entre forma de extração e espécie de trevo, como pode ser observado na Tabela 17.

Entre as espécies de trevo a que apresentou resultados mais expressivos na redução do IVG foi o trevo vermelho (Tabela 17.), com redução de aproximadamente 74%. Já para a forma de extração, a que apresentou melhor resultado foi o extrato alcóolico com redução de aproximadamente 76,9% do IVG quando comparado com a testemunha.

Tabela 17. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de picão preto (*Bidens sp.*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculososo	
Testemunha	8,90 aA	8,90 aA	8,90 aA	8,90 a
Infusão	3,11 bA	2,40 bB	2,82 bA	2,78 b
Maceração	3,39 bA	2,75 bB	3,25 bA	3,13 b
Alcólico	2,26 cA	1,78 cB	2,12 cA	2,05 c
Média	4,41 A	3,96 B	4,27 A	
CV	31,36			

Medias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O aumento da concentração dos extratos de trevo resultou em um atraso na germinação das sementes de picão preto, como pode ser observado na figura 20.

Resultado semelhante foi encontrado por Fortes et al. (2009), aonde trabalhando com extrato aquoso de sabugueiro (*Sambucus nigra* L.) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) observaram que o aumento da concentração dos extratos diminuiu o IVG de sementes de picão preto chegando a zero a partir da concentração de 40% de extrato de sabugueiro.

Os resultados obtidos neste trabalho contrariam a afirmação de Ferreira (2004), segundo ele a porcentagem final de germinação normalmente é menos influenciada pela presença dos compostos alelopáticos em baixas concentrações, enquanto a velocidade média de germinação é mais sensível, resultando em alterações na curva de germinação. Porém neste experimento observou-se que tanto a germinação como o IVG, apresentaram expressiva redução dos valores pela aplicação dos extratos de trevo, mesmo em baixas concentrações.

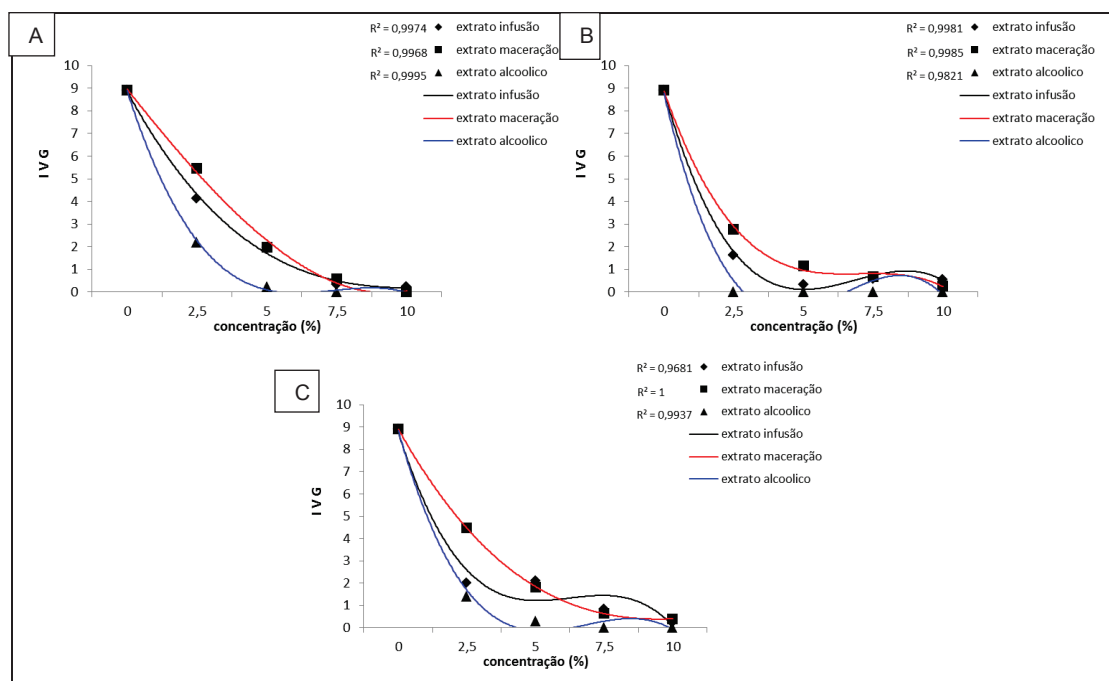


Figura 20. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de picão preto (*Bidens* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso), UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Atraso no IVG e na germinação são pontos favoráveis na redução da população de plantas daninhas nas lavouras, sendo os trevos uma importante ferramenta no manejo integrado de controle de plantas daninhas, podendo ser utilizado na rotação de culturas no período de inverno, pois além de controlar as plantas daninhas, ainda apresenta a característica de fixar nitrogênio no solo, favorecendo assim o desenvolvimento da cultura subsequente (ARGENTA et al., 2001).

Em relação ao comprimento de raiz (CR) a forma de extração que em geral resultou nas maiores reduções no CR foi o alcoólico (Tabela 18), com redução média de 61,1%. Os extratos de trevo vermelho causaram as maiores reduções no CR (redução média de 42%), exceto no extrato por maceração, aonde o trevo branco apresentou os menores valores de CR, com redução média de 49,3% comparado com a testemunha.

Tabela 18. Comprimento (cm) de raiz de plântulas de picão preto (*Bidens* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			
	Branco	Vermelho	Vesiculoso	Média
Testemunha	2,25 aA	2,25 aA	2,25 aA	2,25 a
Infusão	1,89 aAB	1,71 bB	2,15 aA	1,93 a

Continua na próxima página

				Continuação
Maceração	1,33 bB	2,41 aA	2,02 aA	1,92 a
Alcólico	1,76 abA	0,45 cB	0,85 bB	1,02 b
Média	1,81 A	1,70 A	1,82 A	
CV	36,17			

Medias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A elevação da concentração dos extratos utilizados na germinação de sementes de picão preto reduziu o crescimento do sistema radicular das plântulas (Figura 21.), demonstrando o potencial alelopático das plantas de trevo na diminuição do desenvolvimento inicial de plântulas de picão preto. Este efeito, muitas vezes é considerado de maior importância na alelopatia, pois do ponto de vista ecológico, é um mecanismo de seleção mais eficiente do que evitar a germinação da planta daninha, porque a descendência é eliminada pelo não estabelecimento da planta, devido à baixa exploração do sistema radicular (PIRES et al., 2001).

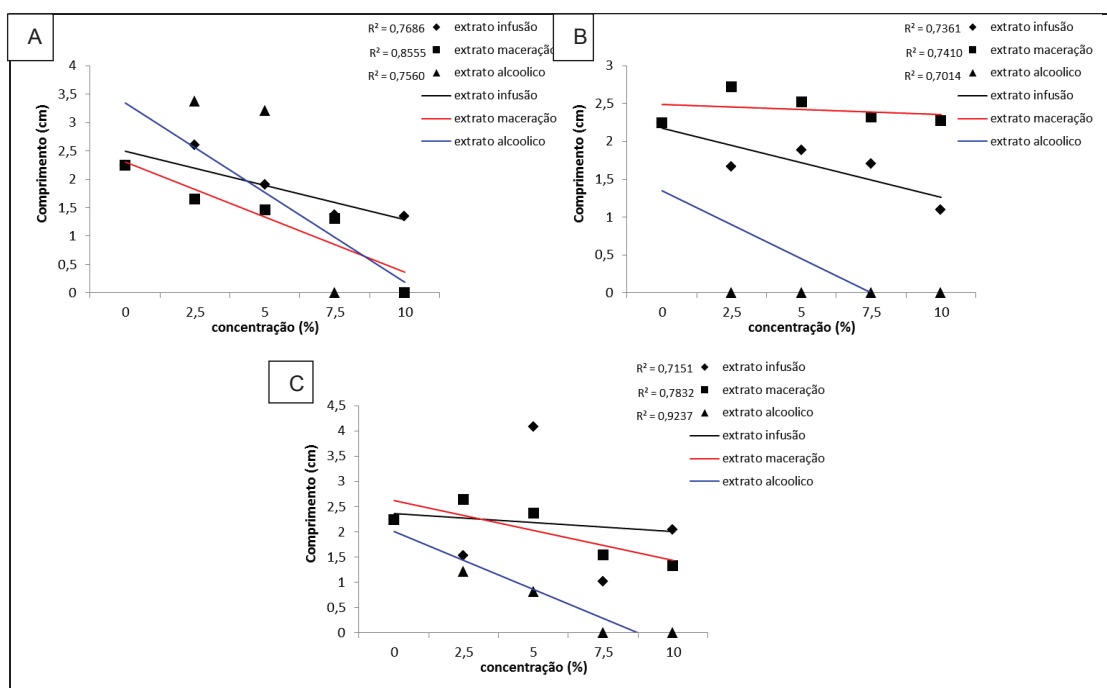


Figura 21. Comprimento (cm) de raiz de plântulas de picão preto (*Bidens* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso), UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Fortes et al. (2009), trabalhando com extratos aquosos de sabugueiro (*Sambucus nigra* L.) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*), observaram que o aumento da concentração dos extratos reduziu o comprimento de raiz de plântulas de picão pre-

to. Analisando o efeito do extrato aquoso de nim (*Azadirachta indica*) sobre as sementes de picão preto, Rickli et al. (2011), observaram que o aumento da concentração diminuiu a germinação e o IVG das sementes, assim como reduziu também o CR das plântulas.

Igualmente ao CR, o comprimento da parte aérea (CPA) foi mais afetado negativamente pelo extrato alcoólico de trevo vermelho (Tabela 19), seguido pelo extrato alcoólico de trevo vesiculoso e trevo branco, com redução de 80%, 48,1% e 42,1% respectivamente. Os extratos obtidos à partir do álcool foram mais eficientes na redução do crescimento da parte aérea de plântulas de picão preto, do que os extratos utilizando água como solvente. Já entre as espécies de trevo, a que apresentou resultados mais satisfatórios foi o trevo vermelho, seguido pelo trevo branco, com redução média do CPA de aproximadamente 30,53% e 20,96% respectivamente.

Tabela 19. Comprimento de parte aérea (cm) de plântulas de picão preto (*Bidens* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculoso	
Testemunha	3,45 aA	3,45 aA	3,45 bA	3,45 a
Infusão	2,82 aA	3,22 aA	3,38 bA	3,14 b
Maceração	3,37 aB	3,28 aB	4,26 aA	3,64 a
Alcoólico	1,99 bA	0,69 bB	1,79 cA	1,49 c
Média	2,91 AB	2,66 B	3,22 A	
CV	35,10			

Medias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os extratos de trevo branco e vesiculoso obtidos através do processo de maceração apresentaram elevação do CPA com o aumento das concentrações (figura 22). A partir da concentração de 5% houve redução do crescimento da parte aérea com a elevação das concentrações, o mesmo fato pode ser observado no extrato infusão de trevo vermelho, porém as variações do comprimento não foram tão expressivas. Já para os outros extratos a elevação das concentrações reduziu o CPA.

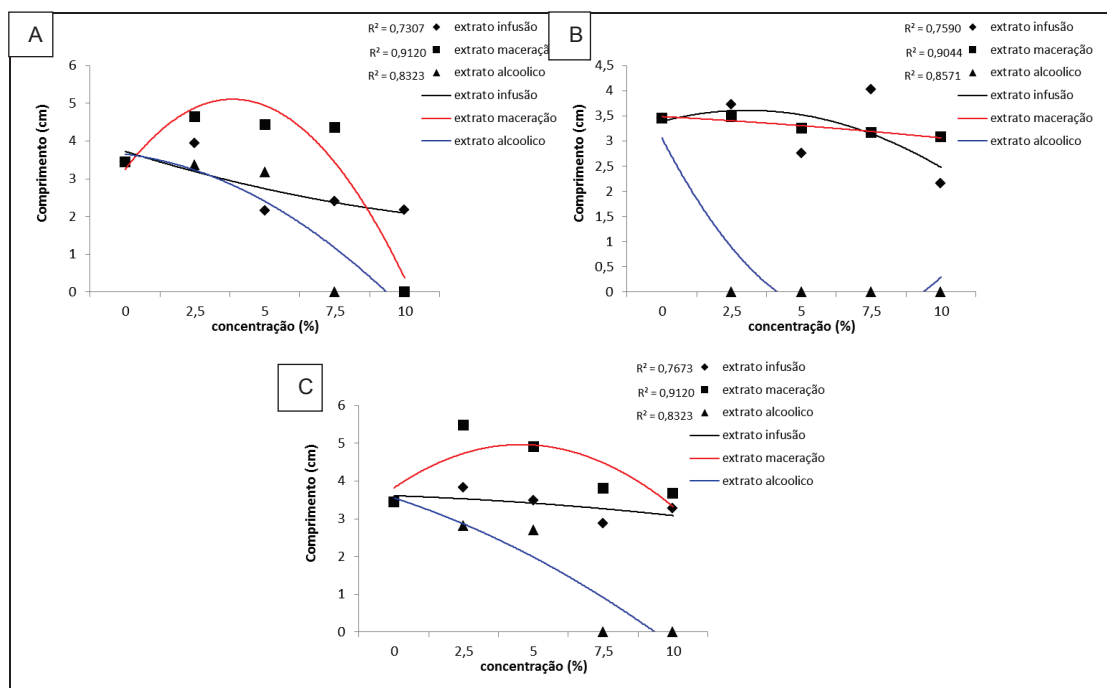


Figura 22. Comprimento (cm) de parte aérea de plântulas de picão preto (*Bidens* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso), UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Resultado semelhante foi encontrado por Hoffmann et al., (2007), aonde o aumento das concentrações dos extratos aquosos de espirradeira (*Nerium oleander*) e comigo-ninguém-pode (*Dieffenbachia amoena*) diminuiu o CR e CPA de picão preto, Segundo os autores, os aleloquímicos podem interferir nas divisões celulares, na formação do câmbio e dos vasos xilemáticos, afetando assim a partição de nutrientes pela plântula, resultando em alteração no alongamento da parte aérea, assim como das raízes.

Vale também ressaltar, que os efeitos dos compostos alelopáticos se relacionam aos processos fisiológicos da planta receptora, de maneira geral, agem como inibidores do crescimento, entretanto a maior parte que são inibitórios em alguma concentração, são também estimulantes quando presentes em menores concentrações (GATTI et al., 2004). Provavelmente esse fator tenha sido o responsável pelo aumento do CPA de plântulas de picão preto submetidos aos extratos de maceração trevo branco e vesiculoso, assim como o extrato de infusão de trevo vermelho, quando em baixas concentrações.

A redução do tamanho de plântula aumenta o potencial de competição de uma cultura sobre as plantas daninhas. Pois diminui a interferência causada por estas, principalmente nos períodos iniciais de desenvolvimento, permitindo que a cultu-

ra se sobressaia apresentando dominância sobre a daninha (GOLDFARB et al., 2009).

O extrato alcóolico de trevo vermelho foi o que apresentou o menor teor de massa seca de raiz (MSR) com redução de aproximadamente 80,2% quando comparado com a testemunha (Tabela 20).

Tabela 20. Massa seca (mg) de raiz de plântulas de picão preto (*Bidens* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculososo	
Testemunha	0,257 aA	0,257 aA	0,257 aA	0,257 a
Infusão	0,221 aA	0,240 aA	0,235 aA	0,232 a
Maceração	0,186 aB	0,280 aA	0,168 bB	0,212 a
Alcólico	0,126 bA	0,051 bB	0,128 bA	0,102 b
Média	0,197 A	0,207 A	0,197 A	
CV	40,67			

Medias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Dentre as formas de extração, o extrato alcóolico se mostrou mais eficiente na redução da MSR (média de 60,5%), do que as outras formas de extração, exceto o extrato maceração de trevo vesiculososo que não apresentou diferença estatística significativa.

Na Figura 23, é possível observar que o aumento da concentração dos extratos, reduziu a MSR, exceto para o extrato por infusão, que para o trevo branco e vermelho apresentou um pequeno aumento na MSR nas menores concentrações, com posterior decréscimo, por outro lado, para o trevo vesiculososo houve redução da MSR até a concentração de 2,5%, com posterior elevação até a concentração de 7,5%.

O comportamento diferenciado dos extratos por infusão pode estar relacionado com a inespecificidade das substâncias alelopáticas, pois uma mesma molécula pode apresentar papéis distintos em função da sua concentração no meio e de sua translocação nos tecidos vegetais (SOUZA; YAMASHITA, 2006). Ou seja, um aleloquímico apresenta seu máximo efeito em uma determinada concentração, sendo que fora dessa dose seu potencial é reduzido.

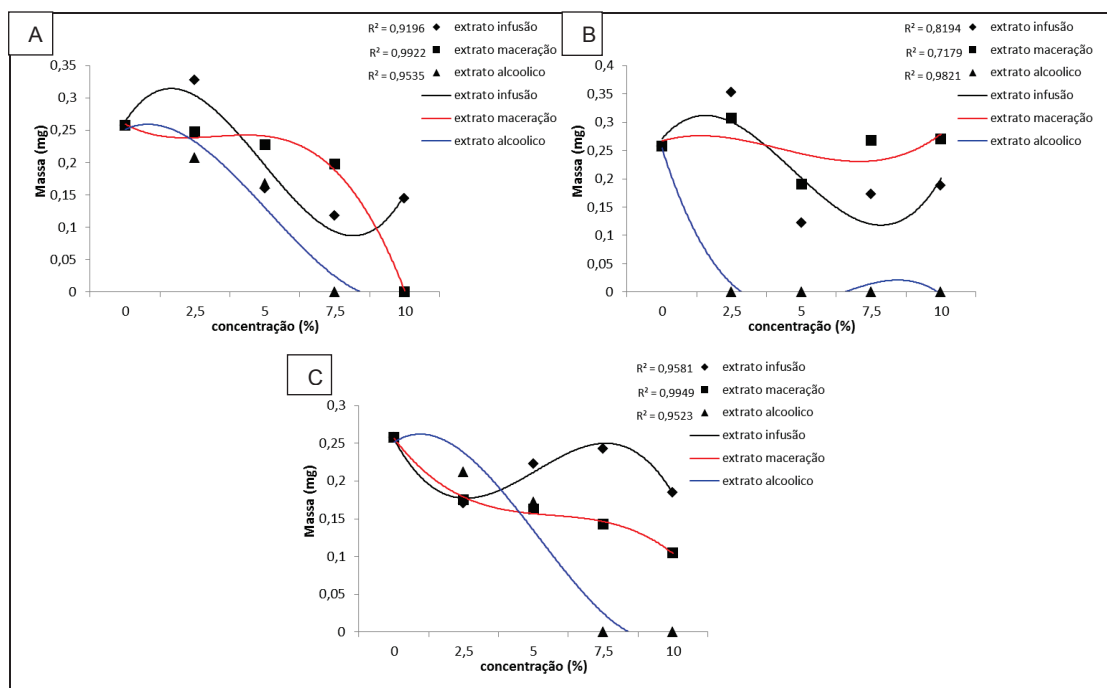


Figura 23. Massa seca (mg) de raiz de plântulas de picão preto (*Bidens* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso), UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

A variável massa seca da parte aérea (MSPA) não apresentou interação entre o tipo de extração, espécie de trevo e concentração do extrato, porém apresentou interação entre tipo de extração e espécie de trevo, demonstrado na Tabela 21.

Tabela 21. Massa seca (mg) da parte aérea de plântulas de picão preto (*Bidens* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Tipo de extração	Espécies de trevo			Média
	Branco	Vermelho	Vesiculoso	
Testemunha	0,325 bA	0,325 aA	0,325 aA	0,325 a
Infusão	0,413 aA	0,335 aAB	0,317 aB	0,355 a
Maceração	0,206 bA	0,289 aA	0,200 bA	0,232 b
Alcólico	0,153 bA	0,065 bA	0,135 bA	0,118 c
Média	0,274 A	0,253 A	0,244 A	
CV	50,63			

Medias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O extrato alcólico e maceração foram os que apresentaram os menores valores de MSPA com redução média de 63,7% e 28,7% respectivamente, exceto maceração de trevo vermelho, o qual não apresentou diferença significativa do extrato por infusão. Entre as espécies, o trevo vesiculoso se apresentou mais eficiente na

redução da massa seca da parte aérea com redução média de aproximadamente 33,1%.

Em relação à concentração dos extratos, a elevação da mesma diminuiu a massa seca da parte aérea (Figura 24). O aumento da concentração dos extratos aquosos de espirradeira e comigo-ninguém-pode diminuiu a massa fresca de plântulas de picão preto (HOFFMANN et al., 2007).

Com base nestes resultados é possível afirmar que as três espécies de trevo utilizadas neste experimento demonstraram potencial alelopático, sendo que, dentre elas, o trevo vermelho se destacou como sendo o que apresentou o maior potencial da redução da germinação das sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de picão preto.

Em relação à forma de extração é possível observar que os extratos em que se utilizou álcool como solvente, estes foram mais eficientes na remoção de compostos com potencial alelopático das plantas de trevos, pois causaram os maiores efeitos negativos sobre as sementes de picão preto.

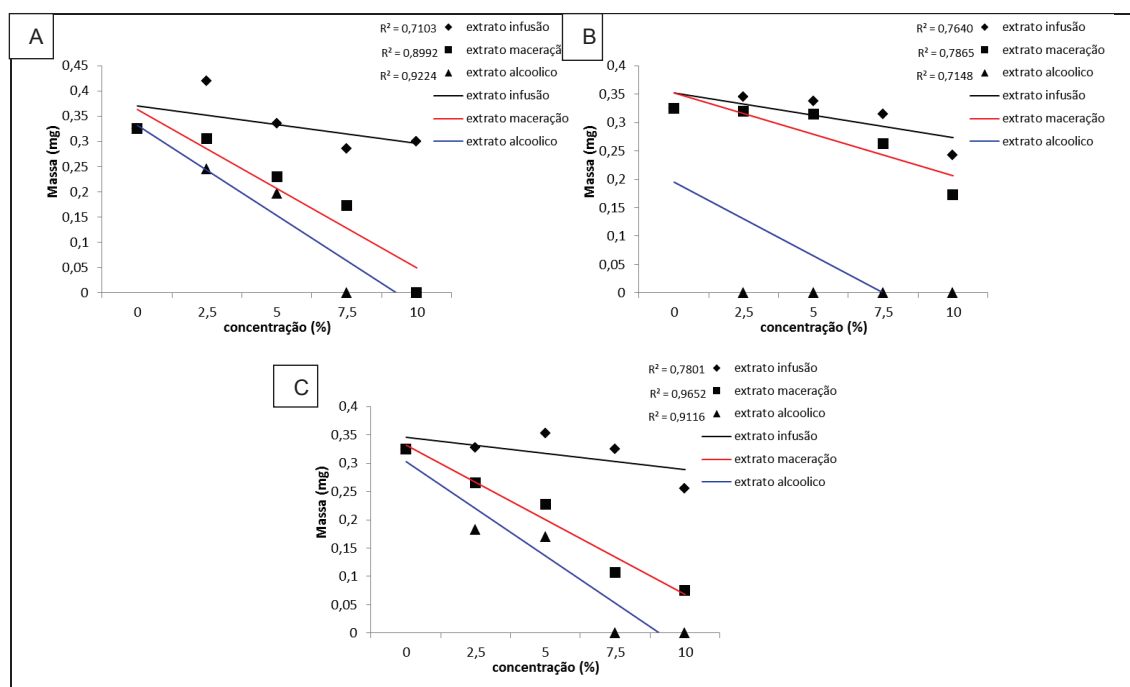


Figura 24 Massa seca (mg) da parte aérea de plântulas de picão preto (*Bidens sp.*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo, (A – trevo branco, B – trevo vermelho, C – trevo vesiculoso), Dois Vizinhos, 2013.

Efeito semelhante foi observado quando utilizado extrato de nim (*Azadirachta indica*), aonde a elevação da concentração diminuiu o acúmulo de massa seca de plântulas de picão preto (FRANÇA et al., 2008).

A variação nos resultados obtidos nas diferentes formas de extração está relacionado com a capacidade de absorção, translocação e mecanismo de ação dos compostos potencialmente alelopáticos extraídos (CORREIA et al. 2005), pelos diferentes métodos.

Por sua vez, o modo de ação dos aleloquímicos está relacionado com os processos fisiológicos na planta, porém seus efeitos ainda não estão completamente esclarecidos. A principal dificuldade está ligada ao fato de que, as substâncias afetam mais de uma função, provocando efeitos secundários difíceis de distinguir dos principais, apresentando em muitos casos uma fitotoxicidade que origina-se mais de um rompimento celular generalizado do que um mecanismo de ação específico (EINHELLIG, 1996).

Analisando os espectros de infravermelho, obtidos dos diferentes extratos (Figura 25), é possível observar que pela intensidade de absorção, o extrato alcoólico foi o que possibilitou uma maior concentração de compostos, exceto para o trevo branco, aonde a extração por infusão apresentou maior concentração de compostos que o alcoólico.

Em relação aos grupos funcionais, observou-se que em todos os extratos há a presença do grupo funcional álcoois e fenóis, com absorção característica de duas bandas, sendo uma banda larga de O-H na região de $3.400-3.300\text{ cm}^{-1}$, e outra banda C-O na região de $1.300-1.000\text{ cm}^{-1}$, há também a presença de anel aromático com absorção característica na faixa de $1.600-1.450\text{ cm}^{-1}$. Esses grupos funcionais levam-nos a confirmar a presença de compostos fenólicos em todos os extratos de trevo, já que estes são basicamente constituídos por um anel aromático e um grupo hidroxila, sendo estes os principais componentes de substâncias alelopáticas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

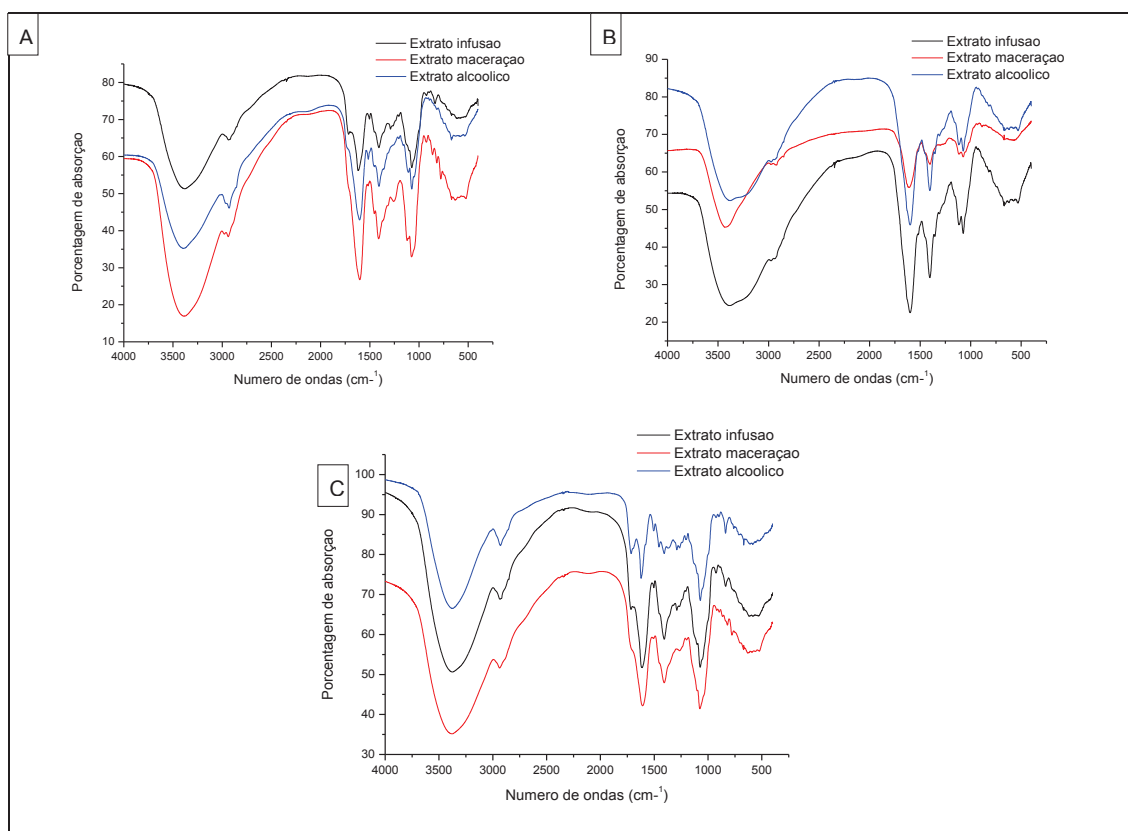


Figura 25. Espectro infravermelho dos extratos de trevo, (**A** – trevo branco, **B** – trevo vermelho, **C** – trevo vesiculoso). Dois Vizinhos, 2013.

Vale ressaltar que o potencial alelopático dos compostos fenólicos está relacionado na capacidade de interferir no desenvolvimento vegetal, pois intervêm na atividade dos hormônios vegetais, se complexando com as giberelinas, sendo antagonísticos com o ácido abscísico e ou aumentando a atividade das auxinas (MAYER et al., 2006).

Considerando os processos de extração, é plausível destacar que o extrato alcoólico foi mais eficiente na extração de compostos orgânicos da matéria seca de trevo, seguido do extrato por infusão e maceração respectivamente, exceto para a espécie de trevo branco, aonde a extração por infusão predominou aos demais processos de extração.

Considerando as espécies de trevo, observou-se que para os extratos maceração e infusão, não houve diferença no espectro obtido à partir de trevo branco e vesiculoso, porém o espectro obtido a partir de trevo vermelho foi diferente em relação às outras espécies de trevo. Por outro lado, os espectros obtidos dos extratos alcoólicos foram diferentes entre as três espécies de trevo, demonstrando que etanol é mais eficiente na extração de compostos do que a água. Isso se deve ao fato do

etanol apresentar uma extremidade apolar, sendo muitas vezes considerado bipolar, já a água é uma substância polar (MOREIRA et al., 2010). Ou seja, o etanol tem a capacidade de extrair um número maior de substâncias dos tecidos vegetais de trevo do que a água, em especial os compostos fenólicos, aos quais de acordo com Taiz; Zeiger (2013) constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos, sendo alguns solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são solúveis em água e outros que são praticamente insolúveis.

Em relação aos métodos de infusão e maceração, pode-se dizer que a maior temperatura utilizada na infusão (100°C) tenha favorecido a diluição dos compostos na água. Segundo Watanabe et al. (2006), as temperaturas mais altas frequentemente favorecem a solubilidade do soluto no solvente.

O efeito alelopático do trevo branco, trevo vermelho e trevo vesiculoso, provavelmente esteja relacionados ao isoflavonóis, os quais de acordo com Taiz; Zeiger (2013) possuem várias atividades biológicas destacando atividades antifúngicas e antibacterianas (fitoalexinas), atividade estrogênica e propriedades inseticidas, sendo que estes autores relatam a presença dos isoflavonóides em plantas de trevo.

O efeito alelopático das espécies de trevo no controle de plantas daninhas deve ser mais aprofundado, pois neste estudo inicial, observou-se que estas, apresentaram efeito sobre a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de picão preto, sendo uma alternativa viável no controle alternativo de plantas daninhas.

O maior efeito alelopático do trevo vermelho sobre as sementes de picão preto pode estar relacionado com algum composto específico que não está presente nos trevos branco e vesiculoso ou está presente em pequena quantidade, fato que pode ser confirmado analisando os espectros de infravermelho, aonde é possível observar que os espectros de trevo vermelho foram diferentes dos de trevo branco e vesiculoso em todos os métodos de extração.

Porém, vale ressaltar a necessidade de desenvolver estudos no intuito de isolar o composto alelopático dos trevos estudados, assim como avaliar se esse mesmo efeito encontrado em laboratório ocorre no campo.

4.6 CONCLUSÕES

As espécies de trevos branco, vermelho e vesiculososo nas diferentes formas de extração apresentam efeito alelopático em sementes e plântulas de picão preto, com destaque para o extrato alcoólico de trevo vermelho.

Os principais compostos identificados nos espectros dos extratos de trevo foram os compostos fenólicos, sendo estes sugeridos como responsáveis pelo efeito alelopático.

Os efeitos alelopáticos verificados variaram, em função da forma de extração, bem como das concentrações.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC nº 10, de 9 de Março de 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html>. Acessado em: 27/março/2014.

ARGENTA, Gilber; SILVA, Paulo. R. F. da; FLECK, Nilson. G; BORTOLINI, Clayton. G; NEVES, Rodrigo; AGOSTINETTO, Dirceu. Efeitos do manejo mecânico e químico da aveia-preta no milho em sucessão e no controle do capim-papuã. **Pesq. agrop. bras.** Brasília, v. 36, n. 6, p. 851-860, 2001.

BORELLA, Junior ; PASTORINI, Lindamir. H. Influência alelopática de *Phytolacca dioica* L. na germinação e crescimento inicial de tomate e picão-preto. **Revista Biotemas**, v.22, n.3, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Regra para análise de sementes**. Brasília, 1º edição, p. 399, 2009.

CARVALHO, A. M. Como rotacionar cultivos: na escolha dos cultivos, deve-se compatibilizar produção de grãos, biomassa e cobertura do solo. **DBO Agrotecnologia**, São Paulo, v. 1, n.1, p. 30-31, nov. 2006.

CORREIA, N.M.; CENTURION, M.A.P.C. & ALVES, P.L.C.A. Influência de extratos aquosos sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de soja. **Ciência Rural**, v.35, p.498-503, 2005.

CORSATO, Jaqueline. M; FORTES, Andréa. M. T; SANTORUM, Márcia; LESZCZYNSKI, Raquel. Efeito alelopático do extrato aquoso de folhas de girassol sobre a germinação de soja e picão preto-preto. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 353-360, 2010.

CRUZ, S. E. M.; NOZAKI, M. H.; BATISTA, M. A. Plantas medicinais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 15, p. 28-34, 2000.

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

FERREIRA, A. G. Interferência: competição e alelopatia, In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p.324, 2004.

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

FERREIRA, Magda. C; SOUZA, José. R. P. de. FARIA, Terezinha. de. J. Potenciação alelopática de extratos vegetais na germinação e no crescimento inicial de picão preto-preto e alface. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1054-1060, 2007.

FORTES, Andréa.M.T; MAULI, Márcia.M; ROSA, Danielle.M; PICCOLO, Gislaine. MARQUES, Denise.S; REFOSCO, Rachel.M.de.C. Efeito alelopático de sabugueiro e capim- Efeito alelopático de sabugueiro e capim-limão na germinação de limão na germinação de picão preto-preto e soja. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 31, n. 2, p. 241-246, 2009.

FRANÇA, André.C; SOUZA, Itamar.F.de; SANTOS, Cláudio.C.dos; OLIVEIRA, Eliane.Q.de; MARTINATTO, Cristiano. Atividades alelopáticas de nim sobre o crescimento de sorgo, alface e picão preto-preto. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1374-1379, 2008.

GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia eschscholae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botânica Brasilica**, v.18, n.3, p.459-472, 2004.

GOLDFARB, Míriam; PIMENTEL, Livia.W; PIMENTEL, Nara.W. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v.3, n.1, p.23-28, 2009.

HOFFMANN, Clairomar.E.F; NEVES, Luiz.A.S.das; BASTOS, Cristiane.F; WALLAU, Gabriel.da.L. Atividade alelopática de *Nerium Oleander* L. e *Dief enbachia picta* schott em sementes de *Lactuca Sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.6, n.1, p. 11-21, 2007.

MAYER, Juliana.L.S; BIASI, Luiz.A; BONA, Cleusa. Capacidade de enraizamento de estacas de quatro cultivares de *Vitis* L. (Vitaceae) relacionada com os aspectos anômicos. **Acta bot. bras.**, v. 20, n.3, p. 563-568, 2006.

MAZZAFERA, Paulo Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasil. Bot.**, V.26, n.2, p.231-238, 2003.

MORAES, Pedro. V. D. de; AGOSTINETTO, Dirceu; PANOZZO, Luis. E; GALON, Leandro; OLIVEIRA, Claudia; DAL MAGRO, Taísa. Potencial alelopático de extratos aquosos de culturas de cobertura de solo na germinação e desenvolvimento inicial de *Bidens pilosa*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 1299-1314. 2012.

MOREIRA, Leonardo. M; RODRIGUES, Máira. R; OLIVEIRA, Heuder. P. M. de; LIMA, Adriana; SOARES, Rafael. R. S; BATISTELA, Vagner. R; GEROLA, Adriana. P; HIOKA, Noboru. Influência de diferentes sistemas de solventes água-etanol sobre as propriedades físico-químicas e espectroscópicas dos compostos macrocíclicos feofitina e clorofila. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 2, 258-262, 2010.

NÓBREGA, Lúcia.H.P; LIMA, Gislaine, P.DE; MARTINS, Gislaine.I; MENHGHETTI, Adriana.M. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de soja (*Glycine max* L. Merrill) sob cobertura vegetal. **Acta Scientiarum, Agronomy**. Maringá, v. 31, n. 3, p. 461-465, 2009.

PIRES, Nádja.de.M; SOUZA, Isabel.R.P; PRATES, Hélio.T; FARIA, Trícia.C.L.de; PEREIRA FILHO, Israel.A; MAGALHÃES, Paulo.C. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v.13, n.1, p.55-65, 2001.

RICKLI, Helena.C; FORTES, Andrea.M.T; SILVA, Paulo.S.S; PILATTI, Daiane.M; HUTT, Daniele.R. Efeito alelopático de extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. em alface, soja, milho, feijão e picão preto-preto. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 473-484, 2011.

SOUZA FILHO, A.P.S. Atividade potencialmente alelopática de extratos brutos e hidroalcoólicos de feijão-de-porco (*canavalia ensiformis*). **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.20, n.3, p.357-364, 2002.

SOUZA, Marcelo.F.P; YAMASHITA. Oscar.M. Potencial alelopático da mucuna-preta sobre a germinação de sementes de alface e picão preto preto. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.4, n.1, p.23-28, 2006.

TAIZ, Lincon; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia vegetal**; Tradução: DIVAN JUNIOR et al., 5o ed., Porto Alegre: Artmed, p.918, 2013.

TEIXEIRA, Cícero.M; ARAÚJO, João.B.S; CARVALHO, Gabriel.J.de; Potencial alelopático de plantas de cobertura no controle de picão preto-preto (*bidens pilosa* L.). **Ciência agrotecnica**, Lavras, v.28, n.3, p.691-695, 2004.

VERDI, Luiz.G; BRIGHENTE, Inês.M.C; PIZZOLATTI, Moacir.G. Gênero baccharis (asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, Vol. 28, No. 1, p.85-94, 2005.

WARDLE, A.D. AHMED, M.; NICHOLSON, K.S., Allelopathic influence of nodding thistle (*Carduus nutans* L.) seed on germination and radicle growth of pasture plants. **Journal Agriculture Research**, New Zealand, v.34, n.2, p.185-191, 1991.

WATANABE, C.B; NOSSE, T.M; GARCIA, C.A; PINHEIRO, N.P. Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v.8, n.4, p.76-86, 2006.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trevo branco, trevo vermelho e trevo vesiculoso nas diferentes formas de extração apresentam efeito alelopático em sementes e plântulas de milho, milhã e picão preto, com destaque para os extratos obtidos à partir do etanol.

Apesar de as espécies de trevo terem apresentado potencial no controle de plantas daninhas através da alelopatia, sua utilização no manejo de plantas daninhas requer cuidados, já que os mesmos apresentaram efeito alelopático também sobre a cultura do milho

Os principais compostos identificados nos espectros dos extratos de trevo foram os compostos fenólicos, sendo estes, sugeridos como responsáveis pelo efeito alelopático.

Apesar de este estudo ter demonstrado o potencial alelopáticos das plantas de trevo sobre plantas da daninhas e até mesmo sobre plantas cultivadas, é necessário que haja um estudo mais aprofundado sobre esse potencial alelopático, principalmente no intuito de avaliar se esse mesmo efeito observado em laboratório ocorrerá em condições de campo, além do período que essas substâncias permanecerão ativas no solo.

APÊNDICES

Apêndice A. Resumo do quadro da ANOVA, da germinação das sementes de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	37.185,14	18.592,57	918,40**
Tipo de extração (F2)	2	15.366,21	7.683,10	379,51**
Concentração (F3)	4	61.325,07	15.331,26	757,30 ^{ns}
Int. F1xF2	4	31.547,95	7.886,98	389,58**
Int. F1xF3	8	33.490,68	4.186,33	206,78**
Int. F2xF3	8	6.616,62	827,07	40,85**
Int. F1xF2xF3	16	28.047,21	1.752,95	86,58**
Tratamentos	44	213.578,91	4.854,06	239,72**
Erro	135	2.733,00	20,24	
Total	179	216.311,91		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p \geq 0,05$).

Apêndice B. Resumo do quadro da ANOVA, do índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	3.439,34	1.719,67	2.023,91**
Tipo de extração (F2)	2	414,63	207,31	243,99**
Concentração (F3)	4	3.501,87	875,46	1.030,35 ^{ns}
Int. F1xF2	4	461,20	115,30	135,70**
Int. F1xF3	8	1.121,53	140,19	164,99**
Int. F2xF3	8	549,27	68,65	80,80**
Int. F1xF2xF3	16	1.486,75	92,92	109,36**
Tratamentos	44	10.974,62	249,42	293,55**
Erro	135	114,70	0,84	
Total	179	11.089,32		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p \geq 0,05$).

Apêndice C. Resumo do quadro da ANOVA, do comprimento de raiz de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	979,63	489,81	890,37
Tipo de extração (F2)	2	282,02	141,01	256,33
Concentração (F3)	4	2.551,72	637,93	1.159,61 ^{ns}
Int. F1xF2	4	286,40	71,6	130,15**
Int. F1xF3	8	347,12	43,39	78,87**
Int. F2xF3	8	188,92	23,61	42,92**

Int. F1xF2xF3	16	550,32	34,39	62,52**
Tratamentos	44	5.186,16	117,86	214,25**
Erro	135	74,26	0,55	
Total	179	5.260,42		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p \geq 0,05$).

Apêndice D. Resumo do quadro da ANOVA, do comprimento de parte aérea de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	686,77	343,38	668,96
Tipo de extração (F2)	2	238,74	119,37	232,55
Concentração (F3)	4	1.287,10	312,77	626,85 ^{ns}
Int. F1xF2	4	197,94	49,48	96,40
Int. F1xF3	8	559,24	69,90	136,18**
Int. F2xF3	8	205,29	25,66	49,99**
Int. F1xF2xF3	16	509,95	31,87	62,09**
Tratamentos	44	3.685,08	83,75	163,15**
Erro	135	69,29	0,51	
Total	179	3.754,37		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p \geq 0,05$).

Apêndice E. Resumo do quadro da ANOVA, da massa seca de raiz de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	8.369,90	4.184,5	41,14**
Tipo de extração (F2)	2	3.766,66	1.883,33	18,51**
Concentração (F3)	4	8.128,15	2.032,03	19,97 ^{ns}
Int. F1xF2	4	4.128,24	1.032,06	10,14**
Int. F1xF3	8	6.172,24	771,53	7,58**
Int. F2xF3	8	1.985,43	248,17	2,43*
Int. F1xF2xF3	16	7.057,24	441,07	4,33**
Tratamentos	44	39.607,89	900,17	8,84**
Erro	135	13.732,68	101,72	
Total	179	53.340,68		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p \geq 0,05$).

Apêndice F. Resumo do quadro da ANOVA, da massa seca da parte aérea de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	4.637,62	2.318,81	161,93**
Tipo de extração (F2)	2	4.102,42	2.051,21	143,25**

Concentração (F3)	4	12.706,53	3.176,63	221,84 ^{ns}
Int. F1xF2	4	5.802,34	1.450,58	101,30 ^{**}
Int. F1xF3	8	5.550,10	693,76	48,45 ^{**}
Int. F2xF3	8	2.541,44	317,68	22,18 ^{**}
Int. F1xF2xF3	16	6.585,16	411,57	28,74 ^{**}
Tratamentos	44	41.925,65	952,85	66,54 ^{**}
Erro	135	1.933,06	14,31	
Total	179	43.858,71		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. ^{**}Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). ^{*} Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p > 0,05$).

Apêndice G. Resumo do quadro da ANOVA, de teores de açúcares redutores de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	0,1234	0,0617	157,42 ^{**}
Tipo de extração (F2)	2	0,0172	0,0086	22,05 ^{**}
Concentração (F3)	4	0,0164	0,0041	10,47 ^{ns}
Int. F1xF2	4	0,0590	0,0147	37,65 ^{**}
Int. F1xF3	8	0,0574	0,0071	18,31 ^{**}
Int. F2xF3	8	0,0182	0,0022	5,80 ^{**}
Int. F1xF2xF3	16	0,0252	0,0015	4,01 ^{**}
Tratamentos	44	0,3170	0,0072	18,37 ^{**}
Erro	135	0,0529	0,0003	
Total	179	0,3699		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. ^{**}Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). ^{*} Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p > 0,05$).

Apêndice H. Resumo do quadro da ANOVA, de teores de açúcares solúveis totais de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	108,29	54,14	125,93 ^{**}
Tipo de extração (F2)	2	4,28	2,14	4,89 ^{**}
Concentração (F3)	4	37,25	9,31	21,66 ^{ns}
Int. F1xF2	4	17,10	4,27	9,94 ^{**}
Int. F1xF3	8	57,00	7,12	16,57 ^{**}
Int. F2xF3	8	6,05	0,75	1,76 ^{ns}
Int. F1xF2xF3	16	15,26	0,95	2,21 ^{**}
Tratamentos	44	245,26	5,57	12,96 ^{**}
Erro	135	58,04	0,42	
Total	179	303,30		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. ^{**}Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). ^{*} Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p > 0,05$).

Apêndice I. Resumo do quadro da ANOVA, de teores de proteínas de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	0,63	0,31	19,23**
Tipo de extração (F2)	2	2,32	1,16	70,95**
Concentração (F3)	4	0,93	0,23	14,29 ⁻
Int. F1xF2	4	2,22	0,55	33,93**
Int. F1xF3	8	2,82	0,35	21,56**
Int. F2xF3	8	1,61	0,20	12,33**
Int. F1xF2xF3	16	1,66	0,10	6,34**
Tratamentos	44	12,22	0,27	16,95**
Erro	135	2,21	0,01	
Total	179	14,43		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p > 0,05$).

Apêndice J. Resumo do quadro da ANOVA, da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase de plântulas de milho (*Zea mays*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	0,268	0,134	7,85**
Tipo de extração (F2)	2	0,026	0,013	0,77 ^{ns}
Concentração (F3)	4	0,176	0,044	2,57 ⁻
Int. F1xF2	4	0,162	0,040	2,37 ^{ns}
Int. F1xF3	8	0,348	0,043	2,54*
Int. F2xF3	8	0,205	0,025	1,4 ^{ns}
Int. F1xF2xF3	16	0,369	0,023	1,34 ^{ns}
Tratamentos	44	1,558	0,035	2,06**
Erro	135	2,315	0,017	
Total	179	3,874		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p > 0,05$).

Apêndice K. Resumo do quadro da ANOVA, da germinação das sementes de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	4.280,01	2.140,00	73,40**
Tipo de extração (F2)	2	947,74	473,87	16,25**
Concentração (F3)	4	12.438,31	3.109,57	106,66 ⁻
Int. F1xF2	4	573,28	143,32	4,91**
Int. F1xF3	8	2.142,32	267,79	9,18**
Int. F2xF3	8	540,75	67,59	2,31**
Int. F1xF2xF3	16	1.829,21	114,32	3,92**
Tratamentos	44	22.751,64	517,08	17,73**
Erro	135	3.935,75	29,15	
Total	179	26.668,39		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p > 0,05$).

Apêndice L. Resumo do quadro da ANOVA, do índice de velocidade de germinação (IVG) sementes de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	188,38	94,19	126,02**
Tipo de extração (F2)	2	29,09	14,54	19,46**
Concentração (F3)	4	451,62	112,90	151,06 ^{ns}
Int. F1xF2	4	50,26	12,56	16,81**
Int. F1xF3	8	83,72	10,46	14,00**
Int. F2xF3	8	14,96	1,87	2,50*
Int. F1xF2xF3	16	61,30	3,83	5,12**
Tratamentos	44	879,30	19,98	26,73**
Erro	135	100,90	0,74	
Total	179	980,26		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p > 0,05$).

Apêndice M. Resumo do quadro da ANOVA, do comprimento de raiz de plântulas de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	9,13	4,56	14,74**
Tipo de extração (F2)	2	3,48	1,74	5,62**
Concentração (F3)	4	102,29	25,57	82,53 ^{ns}
Int. F1xF2	4	4,85	1,21	3,91**
Int. F1xF3	8	6,19	0,77	2,49*
Int. F2xF3	8	2,80	0,35	1,13 ^{ns}
Int. F1xF2xF3	16	4,84	0,30	0,97 ^{ns}
Tratamentos	44	133,62	3,03	9,80**
Erro	135	41,83	0,30	
Total	179	175,42		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p > 0,05$).

Apêndice N. Resumo do quadro da ANOVA, do comprimento de parte aérea de plântulas de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	8,02	4,01	25,01**
Tipo de extração (F2)	2	4,57	2,28	14,26**

Concentração (F3)	4	6,33	1,58	9,87 ⁻
Int. F1xF2	4	4,07	1,01	6,35**
Int. F1xF3	8	3,91	0,48	3,05**
Int. F2xF3	8	1,82	0,22	1,41 ^{ns}
Int. F1xF2xF3	16	3,32	0,20	1,29 ^{ns}
Tratamentos	44	32,07	0,72	4,54**
Erro	135	21,65	0,16	
Total	179	53,73		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p > 0,05$).

Apêndice O. Resumo do quadro da ANOVA, da massa seca de raiz de plântulas de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	0,1118	0,0559	144,76**
Tipo de extração (F2)	2	0,0131	0,0065	16,95**
Concentração (F3)	4	0,1345	0,0336	87,07 ⁻
Int. F1xF2	4	0,0432	0,0108	27,97**
Int. F1xF3	8	0,0543	0,0067	17,58**
Int. F2xF3	8	0,0383	0,0047	12,40**
Int. F1xF2xF3	16	0,0444	0,0027	7,19**
Tratamentos	44	0,4398	0,0100	25,87**
Erro	135	0,0521	0,0003	
Total	179	0,4920		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p > 0,05$).

Apêndice P. Resumo do quadro da ANOVA, da massa seca da parte aérea de plântulas de milhã (*Digitaria* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	0,2147	0,1073	96,48**
Tipo de extração (F2)	2	0,0088	0,0044	3,98**
Concentração (F3)	4	0,1294	0,0323	29,09 ⁻
Int. F1xF2	4	0,0621	0,0155	13,97**
Int. F1xF3	8	0,0801	0,0100	9,00**
Int. F2xF3	8	0,0452	0,0056	5,08**
Int. F1xF2xF3	16	0,1309	0,0081	7,35**
Tratamentos	44	0,6716	0,0152	13,71**
Erro	135	0,1502	0,0011	
Total	179	0,8218		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p > 0,05$).

Apêndice Q. Resumo do quadro da ANOVA, da germinação de sementes de picão-preto (*Bidens sp.*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	2.144,43	1.072,21	32,80**
Tipo de extração (F2)	2	406,03	203,01	6,21**
Concentração (F3)	4	102.135,52	25.533,88	781,25 ^{ns}
Int. F1xF2	4	303,33	75,83	2,32*
Int. F1xF3	8	1.648,34	206,04	6,30**
Int. F2xF3	8	1.067,74	133,46	4,08**
Int. F1xF2xF3	16	1.034,88	64,68	1,97*
Tratamentos	44	108.740,30	2.471,37	75,61**
Erro	135	4.412,25	32,68	
Total	179	113.152,55		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p > 0,05$).

Apêndice R. Resumo do quadro da ANOVA, do índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de picão-preto (*Bidens sp.*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	36,30	18,15	26,16**
Tipo de extração (F2)	2	11,58	5,79	8,34**
Concentração (F3)	4	1.891,55	472,88	681,52 ^{ns}
Int. F1xF2	4	0,35	0,08	3,12*
Int. F1xF3	8	38,95	4,86	7,01**
Int. F2xF3	8	31,92	3,99	5,75**
Int. F1xF2xF3	16	6,23	0,38	0,56 ^{ns}
Tratamentos	44	2.016,90	45,83	66,06**
Erro	135	93,67	0,69	
Total	179	2.110,57		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p > 0,05$).

Apêndice S. Resumo do quadro da ANOVA, do comprimento de raiz de plântulas de picão-preto (*Bidens sp.*) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	32,71	16,35	47,14**
Tipo de extração (F2)	2	0,90	0,45	1,30 ^{ns}
Concentração (F3)	4	54,89	13,72	39,55 ^{ns}
Int. F1xF2	4	31,54	7,88	22,72**
Int. F1xF3	8	16,10	2,01	5,80**
Int. F2xF3	8	17,79	2,22	6,41**
Int. F1xF2xF3	16	31,84	1,99	5,73**
Tratamentos	44	185,81	4,22	12,17**
Erro	135	46,84	0,34	

Total	179	232,65
-------	-----	--------

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p \geq 0,05$).

Apêndice T. Resumo do quadro da ANOVA, do comprimento de parte aérea de plântulas de picão-preto (*Bidens* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	151,47	75,73	80,69**
Tipo de extração (F2)	2	16,69	8,34	8,89**
Concentração (F3)	4	94,23	23,55	25,10 ^{ns}
Int. F1xF2	4	18,07	4,51	4,84**
Int. F1xF3	8	61,61	7,70	8,20**
Int. F2xF3	8	38,28	4,78	5,09**
Int. F1xF2xF3	16	36,74	2,29	2,44**
Tratamentos	44	417,11	9,47	10,10**
Erro	135	126,70	0,93	
Total	179	543,82		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p \geq 0,05$).

Apêndice U. Resumo do quadro da ANOVA, da massa seca de raiz de plântulas de picão-preto (*Bidens* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	0,588	0,294	53,60**
Tipo de extração (F2)	2	0,006	0,003	0,62 ^{ns}
Concentração (F3)	4	0,635	0,158	28,5 ^{ns}
Int. F1xF2	4	0,219	0,054	9,99**
Int. F1xF3	8	0,234	0,029	5,34**
Int. F2xF3	8	0,193	0,024	4,41**
Int. F1xF2xF3	16	0,378	0,023	4,30**
Tratamentos	44	2,256	0,051	9,34**
Erro	135	0,740	0,005	
Total	179	2,996		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. **Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p \geq 0,05$).

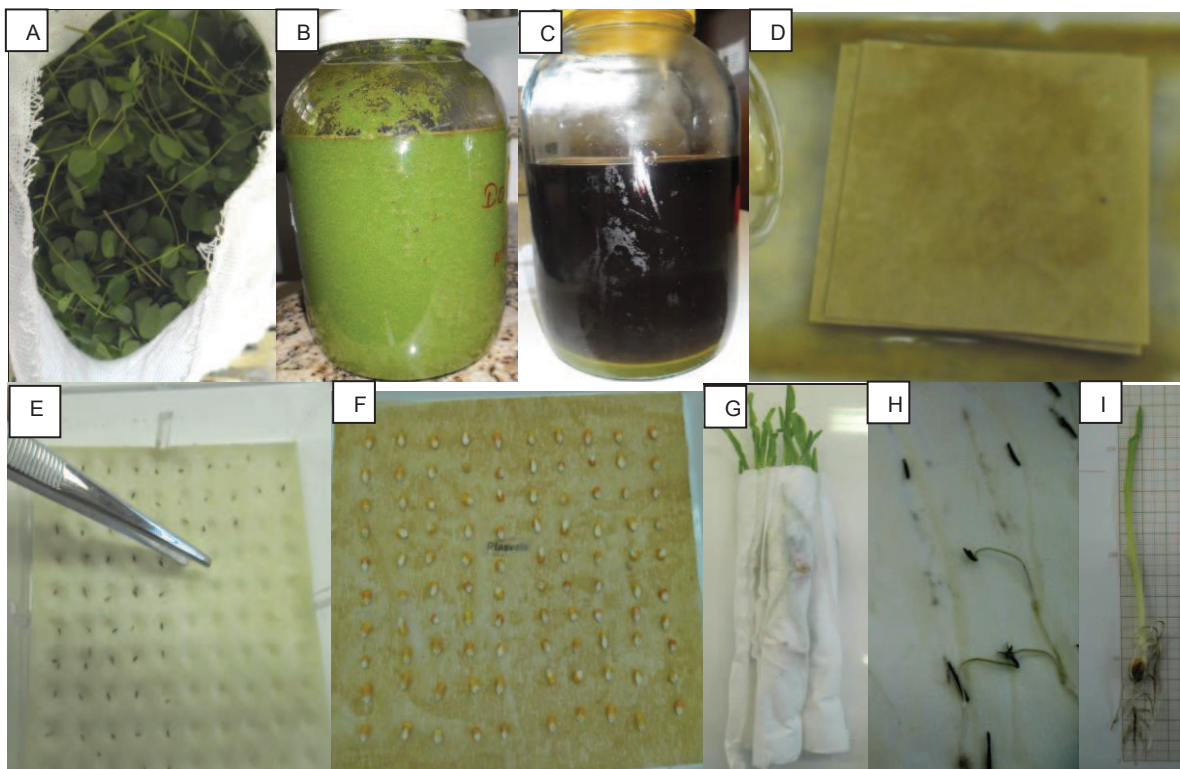
Apêndice V. Resumo do quadro da ANOVA, da massa seca de parte aérea de plântulas de picão-preto (*Bidens* sp.) embebidas com diferentes extratos de espécies de trevo. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Espécie de trevo (F1)	2	1,685	0,842	59,58**

Tipo de extração (F2)	2	0,050	0,025	1,79 ^{ns}
Concentração (F3)	4	0,979	0,244	17,31 ^{**}
Int. F1xF2	4	0,239	0,059	4,22 ^{**}
Int. F1xF3	8	0,485	0,060	4,28 ^{**}
Int. F2xF3	8	0,065	0,008	0,57 ^{ns}
Int. F1xF2xF3	16	0,178	0,011	0,78 ^{ns}
Tratamentos	44	3,685	0,083	5,91 ^{**}
Erro	135	1,910	0,014	
Total	179	5,595		

Os tratamentos são quantitativos, o teste F não é aplicado. ^{**}Significativo à nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). ^{*} Significativo à nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ^{ns} Não significativo ($p > 0,05$).

Apêndice 5. Imagens da montagem e avaliação do experimento. UTFPR, Pato Branco, PR, 2015.



A-Material vegetal fresco. B- Material vegetal em contato com o solvente. C-Extrato depois de filtrado. D-Papel germiteste umedecido com o extrato. E-Semente de milho distribuída no papel. F-Semente de milho distribuída no papel. G-Germinação das sementes de milho após 10 dias. H-Germinação das sementes de picão-preto. I-Avaliação de comprimento de raiz e parte aérea.