

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE *Copaifera langsdorffii* DESF.:

ABORDAGEM FITOQUÍMICA E MOLECULAR

DANILO MIRALHA FRANCO

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Botânica), AC:
Fisiologia e Bioquímica Vegetal**

BOTUCATU - SP

- 2013 -

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE *Copaifera langsdorffii* DESF.:

ABORDAGEM FITOQUÍMICA E MOLECULAR

DANILO MIRALHA FRANCO

**PROF. DR. LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA
ORIENTADOR**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Botânica), AC:
Fisiologia e Bioquímica Vegetal**

**BOTUCATU - SP
- 2013 -**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Franco, Danilo Miralha.

Atividade alelopática de *Copaifera langsdorffii* Desf.: Abordagem fitoquímica e molecular / Danilo Miralha Franco. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luiz Fernando Rolim de Almeida

Capes: 20303009

1. Fisiologia vegetal. 2. Alelopatia. 3. Biologia Molecular. 4. Expressão gênica. 5. Copaíba. 6. Ácido ribonucleico.

Palavras-chave: Perfil Químico, Alelopatia, SHR, miRNA 166, HD-ZIP III.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais e minhas irmãs, pois a família é a base para suportar tudo.

Ao meu orientador Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida, pela oportunidade, confiança e orientação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.

Aos meus amigos do Laboratório de Ecofisiologia, Angélica, Jennifer, Talita, Ângelo, Liane, Roberto e Dariane.

Ao pessoal do Laboratório de genética de desenvolvimento vegetal, prof. Fábio Tebaldi, Eder, Cristiane, Gicela e Mike.

Aos meus amigos Fabio Seiva e Gustavo Chuffa, grandes companheiros de república, e também a todos os outros amigos de Botucatu.

A todos os amigos do departamento de Botânica; Alunos, Professores e Funcionários.

Aos amigos de Assis, em especial Igor e Tati.

E por último, mas não menos importante, a minha namorada, Camila, que foi a pessoa que mais ouviu sobre tudo que ocorreu durante esses 18 meses.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuiu para o desenvolvimento desse trabalho.

"Tudo que o homem não conhece não existe para ele. Por isso o mundo tem, para cada um, o tamanho que abrange o seu conhecimento."

Carlos Bernardo González Pecotche

Sumário

Resumo.....	7
Abstract.....	9
Lista de Tabelas.....	11
Lista de Figuras.....	12
I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
1. Alelopatia.....	15
2. Prospecção das espécies.....	19
3. Expressão gênica e desenvolvimento de raiz.....	22
4. Justificativa	27
5. Referências.....	28
II. ARTIGO CIENTÍFICO.....	39
Resumo.....	40
Abstract.....	41
1. Introdução.....	42
2. Material e métodos.....	45
2.1 Coleta de material vegetal.....	45
2.2 Preparo dos extratos.....	46
2.3 Análise do perfil cromatográfico.....	47
2.4 Ensaio biológicos.....	47
2.5 Identificação <i>in silico</i> de genes de interesse em sorgo.....	48
2.6 Isolamento e quantificação do RNA total.....	51
2.7 Síntese de cDNA via <i>pulsede stem -loop</i> RT-PCR.....	51
2.8 Avaliação da expressão gênica por qPCR.....	52
3. Resultados e Discussão.....	53
3.1. Análise do perfil cromatográfico de copaíba em diferentes sazonalidades.....	53
3.2. Ensaio Biológicos.....	55
4. Referências.....	62
III. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
IV. REFERÊNCIAS.....	71

RESUMO

Atividade alelopática de *Copaifera langsdorffii* Desf.: abordagem fitoquímica e molecular

As condições ambientais existentes no Cerrado, como déficit hídrico e incidência solar, colaboram para o diversificado laboratório químico que sintetiza e seleciona os compostos produzidos por essas plantas. O contraste sazonal nas fitofisionomias do Cerrado entre a época seca e úmida é um dos fatores que podem alterar as concentrações de metabólitos secundários em plantas. Os compostos produzidos pelo metabolismo secundário podem ser fenilpropanoides, terpenos, alcaloides e esteroides que possuem atividade biológica e são responsáveis pela interação química entre as plantas. Os aleloquímicos são mediadores da comunicação química entre os vegetais e os mecanismos de ação estão relacionados com inúmeros processos bioquímicos e fisiológicos regulados por diferentes conjuntos de genes. Diversos processos biológicos relacionados com o desenvolvimento vegetal são regulados por genes específicos cuja expressão é controlada por microRNAs e outros RNAs regulatórios. O uso da Biologia Molecular pode elucidar os mecanismos de ação fitotóxicos responsáveis pelas respostas fisiológicas envolvidas na atividade alelopática e mostrar novos alvos bioquímicos e fisiológicos na alelopatia. A avaliação da atividade alelopática de frações enriquecidas e substâncias puras de extratos com reconhecida atividade alelopática pode elucidar mecanismos de ação e os efeitos a nível molecular associados às vias fisiológicas afetadas. O objetivo do trabalho foi avaliar o perfil químico e o potencial alelopático de extratos orgânicos de folhas de *Copaifera langsdorffii* coletadas em épocas seca e úmida. Para tanto foram verificados o índice de velocidade de germinação (IVG), o crescimento radicular e o padrão de expressão gênica [SHORT- ROOT (SHR); miRNA166; FT HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER (HD ZIP III) com os genes REVOLUTA (REV), PHABULOSA (PHB) e PHAVOLUTA (PHV)] e características fenotípicas de plântulas de *Sorghum bicolor*. A comparação do perfil fitoquímico observado nos cromatogramas, não indicam modificações qualitativas nos extratos coletados em diferentes épocas. A intensidade de absorção de UV dos picos presentes nos cromatogramas possibilitaram identificar a presença de flavonoides e ácidos fenólicos nos extratos. A velocidade de germinação diminuiu, porém o número de sementes germinadas não foi afetado. O crescimento inicial de raiz mostrou sofrer efeito inibitório em todas as doses testadas, tanto de extratos de época seca quanto úmida. A expressão gênica se mostrou bastante alterada em relação ao controle, onde SHR e miRNA 166 apresentaram um grande aumento na expressão, sendo este aumento maior em raízes

tratadas com extrato de época úmida. Já os fatores de transcrição HD-ZIP III (PHV, PHB e REV) apresentaram um aumento na expressão em raízes tratadas por ambos extratos, porém em raízes tratadas com extrato de época seca o aumento foi maior, principalmente em PHB. Esse padrão de expressão pode explicar as características fenotípicas obtidas onde plântulas tratadas com extrato de época úmida apresentam raízes mais curtas que aquelas tratadas com extrato de época seca. Plântulas tratadas com extrato de época seca também apresentaram raízes reduzidas, porém com maior número de raízes laterais. Portanto, embora o crescimento das raízes tenha sido afetado por ambos extratos, somente quando avaliamos a expressão gênica dos alvos moleculares mencionados podemos determinar qual extrato vegetal apresenta maior capacidade de inibição. O extrato de época úmida afetou drasticamente os alvos moleculares responsáveis pela identidade celular do meristema apical da raiz, fato que levou a forte redução do crescimento. Na época úmida as folhas não apresentam mecanismos de restrição à perda de água, o que leva à máxima abertura estomática e, portanto, a maior entrada de gás carbônico pelos poros estomáticos. Assim, a disponibilidade de carbono para o metabolismo primário e secundário passa ser maior e conseqüentemente as rotas metabólicas podem alterar a quantidade de substâncias produzidas, bem como apresentar maior diversidade de esqueletos carbônicos com atividades biológicas.

Palavras-chave: Perfil químico, Alelopatia, SHR, miRNA 166, HD-ZIP III

ABSTRACT

Allelopathic activity of *Copaifera langsdorffii* Desf.: phytochemical and molecular approach

The environmental conditions in the Cerrado, like drought and solar incidence, collaborate to diverse chemical laboratory that synthesizes and selects compounds produced by these plants. The seasonal contrast in the Cerrado vegetation types between dry and wet season is one of the factors that can alter the concentrations of secondary metabolites in plants. The compounds produced by secondary metabolism can be phenylpropanoids, terpenes, alkaloids and steroids that have biological activity and are responsible for the chemical interaction between plants. The allelochemicals are mediators of chemical communication between plants and mechanisms of action are related to numerous biochemical and physiological processes regulated by different sets of genes. Specific genes whose expression is controlled by microRNAs and other regulatory RNAs regulate several biological processes related to plant development. The use of molecular biology may elucidate the mechanisms of action responsible for phytotoxic physiological responses involved in allelopathic activity and show new targets in biochemical and physiological allelopathy. The evaluation of the allelopathic activity of enriched fractions of extracts and pure compounds with known allelopathic activity may elucidate mechanisms of action and effects at the molecular level associated with physiological pathways affected. The objective of this study was to evaluate the chemical profile and allelopathic potential of organic extracts of leaves collected *Copaifera langsdorffii* in dry and wet seasons. Therefore, we checked the germination speed index (GSI), root growth and the pattern of gene expression [SHORT- ROOT (SHR); miRNA166; FT HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER (HD ZIP III) with genes REVOLUTA (REV), PHABULOSA (PHB) e PHAVOLUTA (PHV)] and phenotypic characteristics of seedlings of *Sorghum bicolor*. A comparison of phytochemical profile observed in the chromatograms indicates no qualitative changes in the extracts collected at different times. The intensity of UV absorption peaks present in the chromatogram to identify the possible presence of flavonoids and phenolic acids in the extracts. The germination rate decreased, but the number of germinated seeds was not affected. The initial root growth showed suffer inhibitory effect at all doses tested, both extracts as wet dry season. Gene expression showed significantly

amended in relation to the control, where SHR and 166 miRNA showed a large increase in expression, and this increase was greater in roots treated with extract of wet season. Since the transcription factors HD-ZIP III (PHV, PHB and REV) showed an increased expression in roots treated with both extracts, but in roots treated with extract of the dry season increase was higher, mainly PHB. This pattern of expression may explain the phenotypic characteristics obtained where seedlings treated with extract of wet season have shorter roots than those treated with extract of the dry season. Seedlings treated with extract of roots dry season also showed reduced but higher number of lateral roots. So while root growth was affected by both extracts, only when we evaluated the gene expression of molecular targets mentioned can determine which plant extract has greater capacity inhibition. The wet season extract drastically affected the molecular targets responsible for cell identity of the root apical meristem, which has led to strong growth reduction. In the wet season the sheets have no mechanisms for restricting the loss of water which takes the maximum stomata aperture and hence the largest entry of carbon dioxide stomata pores. Thus, the availability of carbon for the primary and secondary metabolism increases and consequently be passing the metabolic pathways can alter the amount of substances produced as well as provide greater diversity of carbon skeletons with biological activities.

Key words: Chemical profile, Allelopathy, SHR, miRNA 166, HD-ZIP III

Lista de tabelas

Tabela 1 – Variação de parâmetros ecofisiológicos em época de seca e época de chuva.	46
Tabela 2 - Genes relacionados a formação do meristema apical e lateral, já descritos na literatura, os quais tiveram sua expressão analisada via RT-qPCR. A tabela mostra os acessos referentes ao sorgo e o melhor resultado do BLASTp.	49
Tabela 3 - Iniciadores específicos utilizados na avaliação da expressão gênica via qPCR.	52
Tabela 4 – Efeito do extrato de copaíba de época úmida (EEU) e seca (EES) na germinação de sementes de sorgo. ns: A média geral do tratamento não difere significativamente da média geral do controle; $p>0,05$	57

Lista de figuras

- Figura 1 - *Copaifera langsdorffii* Desf. Fonte: Roberto de Oliveira Portella. 21
- Figura 2 - Padrão dos tecidos observados na raiz de *A.thaliana*. Esquema de um corte longitudinal mostrando o padrão apical-basal e de um corte transversal mostrando o padrão radial. Adaptado de Furuta et al. (2012). 23
- Figura 3 - O crescimento da raiz de plântulas com 7 dias de idade de Col-0 (tipo selvagem), e mutantes shr-2, e shr-6, ambos mutantes nulos, demonstram crescimento radicular precocemente determinado. Barra = 1 cm. Retirado de Yu et al. (2010). 24
- Figura 4 – Mecanismo de regulação fisiológica dos genes SHR, HDZIPIII e do miR166 adaptado de Carlsbecker et al. (2010). 25
- Figura 5 – Modelo da biogênese e ação de microRNAs em plantas. 26
- Figura 6 – Gráfico de precipitação ao longo do ano de 2010. 45
- Figura 7 – Dendograma de similaridade comparando as sequências identificadas em *Sorghum bicolor* com *Arabidopsis thaliana*. O dendograma final foi gerado utilizando o programa MEGA 5.05, com o modelo de comparação *Neighbor-joining*, método de distância *p* e supressão *pair-wise*. A robustez dos ramos gerados na árvore pôde ser medida pelo teste probabilístico de *bootstrap*, originado a partir de 1000 replicatas. 50
- Figura 8 – Cromatograma (A-CLAE; B-CCDC) comparativo entre extratos metanólicos de folhas de *C. langsdorffii* coletadas em diferentes sazonalidades. Espectro UV/FDA e exemplo estrutural das moléculas, em (C) um ácido fenólico (tempo de retenção 12 min.), em (D) o maior pico do cromatograma (tempo de retenção 18 min.) indicando a presença de um flavonoide. 54
- Figura 9 – Índice de velocidade de germinação de plântulas de sorgo sob efeito de diferentes tratamentos (A) porcentagem de crescimento de raízes de sorgo em relação ao controle, sob efeito de diferentes doses e tratamentos (B) *Nível de significância $p < 0,05$ por análise de variância seguido por teste de Tukey. Expressão relativa dos genes SHR, miRNA 166, PHV, PHB e REV em raiz de sorgo tratadas com EEU (C) e EES (D). A expressão dos genes é representada no eixo Y com a razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão de cada gene pelo valor da expressão do gene

normalizador RNA ribossomal 18S. No eixo X estão representados cada gene avaliado e as barras verticais representam o desvio padrão de três amostras biológicas. Plântulas de sorgo tratadas com diferentes extratos de copaíba (E), onde E1-Controle; E2-EEU; E3-EES. EEU = extrato de época úmida; EES = extrato de época seca. 60

I REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Alelopatia

Rice (1984) definiu o termo alelopatia como algum efeito direto ou indireto de uma planta ou um microrganismo, sobre outra planta ou outro microrganismo, através da liberação de substâncias químicas no ambiente. A Sociedade Internacional de Alelopatia define como ciência que estuda processos envolvendo metabólitos secundários, principalmente, produzidos por plantas e diversos tipos de microrganismos como algas, bactérias e fungos que exercem influência no crescimento ou inibem sistemas biológicos com efeitos positivos ou negativos (Pinto et al., 2002).

Os aleloquímicos podem ser liberados por diferentes mecanismos e por diferentes partes da planta. A liberação destes compostos pode ocorrer por lixiviação a partir dos tecidos, por exsudatos liberados pelas raízes e por volatilização de substâncias através da decomposição de partes da planta (Belz, 2007; Bessa et al., 2007). Segundo Rizvi e Rizvi (1992) esses efeitos podem ter uma ação indireta, com alterações nas propriedades do solo, ou ação direta que ocorre através da interferência no crescimento e desenvolvimento da planta, alterações em nível celular, modificações no funcionamento das membranas, balanceamento de fitormônios, fotossíntese e absorção de nutrientes (Rizvi e Rizvi, 1992; Oteiza et al., 2005).

Os compostos aleloquímicos são inseridos no ambiente juntamente com uma variedade diversa de outros metabólitos secundários, fazendo com que o efeito dessa mistura aumente as atividades observadas (Putnam et al., 1986). Segundo Moreira et al. (2008) o elevado potencial de inibição dessa mistura, em alguns casos pode ser confirmado com o fracionamento de um extrato que resulta em diminuição do poder de inibição devido à separação dos aleloquímicos, com natureza química diversificada, que possuem de simples hidrocarbonetos a complexos compostos policíclicos com alto peso molecular. Diferentes rotas metabólicas produzem ácidos graxos de cadeia curta, óleos essenciais, diterpenos, alcaloides, esteroides, compostos fenólicos: flavonoides, naftoquinonas, antraquinonas e derivados de cumarina (Rizvi e Rizvi, 1992; Inderjit e Callaway, 2006). Esses compostos podem ser separados por fracionamento com solventes de diferentes polaridades, como água (polar), etanol (intermediário) e hexano (apolar), a polaridade, portanto, seleciona, na extração, metabólitos com afinidade química de cada solvente.

Os flavonoides são os compostos polifenólicos mais comuns em plantas e estão distribuídos amplamente em alimentos vegetais (Oteiza et al., 2005; Buer et al., 2010). O número de compostos deste grupo que foram identificados ultrapassa 9000 compostos fenólicos, de acordo com Williams e Grayer (2004), incluindo os subgrupos flavonóis, flavononas, antocianidinas e flavonas (Harbone, 1988; Wilhelm Filho et al., 2001). Os

flavonoides são compostos de baixo peso molecular que apresentam um esqueleto carbônico básico (C6-C3-C6), formado por dois anéis fenólicos (A e B) ligados por anel pirano heterocíclico (C). Os átomos de carbono dos anéis C e A são numerados de 2 a 8 e do anel B de 2' a 6' (Kühnau, 1976). Na natureza, os flavonoides são encontrados sob a forma de glicosídeos, podendo ser chamado de bioflavonoides (Wilhelm Filho et al., 2001). Possuem diversas funções no desenvolvimento, crescimento e defesa da planta, apresentam variadas atividades biológicas como ação anti-inflamatória, antialérgica e antitumoral assim como atividades antibacteriana e antifúngica. (Rice-Evans e Packer, 1998). As atividades biológicas desempenhadas pelos flavonoides que mais se destacam são suas atividades antioxidantes, que podem ser demonstradas através da limitação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou eliminação dela (Rice-Evans e Packer, 1998; Bais et al., 2003; Taylor e Grotewold, 2005; Peer e Murphy, 2007). De modo geral, os flavonoides protegem as células do estresse oxidativo pela quelação, inativação ou captação de radicais livres, produzidos pelo sistema de transporte de elétrons (Harbone, 1994). Devido às suas características químicas, capazes de captar elétrons, atuam como catalisadores na fase fotoquímica da fotossíntese e/ou como reguladores de canais iônicos envolvidos na fosforilação oxidativa do processo de obtenção de energia fotossintética (Pietta e Simonetti, 1999). Além destes efeitos conhecidos de atividade antioxidante, os flavonoides apresentam propriedades como estimulação da comunicação entre membranas, regulação do crescimento celular, indução de enzimas de detoxificação, inibição da germinação e crescimento de plântulas (Macias et al., 1997; Yang et al., 2000; Hoagland e Williams, 2004). Muitos autores relatam que o arranjo do anel B dos flavonoides é provavelmente responsável pela atividade alelopática e a relação estrutura-atividade está relacionada com a fitotoxicidade destes compostos (Macias et al., 1997; Bais et al., 2003; Parvez et al., 2004; Beninger e Hall, 2005; Almeida, 2008; De Martino et al., 2012). Evidências de que a atividade dos flavonoides depende da estrutura e dos radicais substituintes do anel B são demonstradas por Bors et al. (1990), essas características estruturais contribuem para aumentar a estabilidade do radical livre e portanto, conferem a atividade antioxidante.

O controle do pH intracelular em células é fundamental para a realização de vários processos fisiológicos importantes, tais como a síntese de proteínas, síntese de DNA e RNA, controle do ciclo celular e transporte de íons pelas membranas (Busa e Nuccitelli, 1984; Gillies e Deamer, 1979; Kurkdjian e Guern, 1989; Hedrich, 2012). O pH citoplasmático é mantido a um valor próximo de neutralidade por mecanismos de troca iônica no plasmalema e pela elevada capacidade de tamponamento do citosol (Roos e Boron, 1981; Kurkdjian e

Guern, 1989; Hedrich, 2012), diferente dos vacúolos, que geralmente têm um pH bastante variável no intervalo de 5 a 6.5, sendo que algumas espécies podem apresentar valores tão baixos como 1.0 (Raven e Smith, 1974; Smith e Raven, 1979; Kurkdjian e Guern, 1989; Hedrich, 2012). No meio intracelular, flavonoides assumem carga negativa em pH neutro, e em baixas concentrações podem promover o crescimento celular aumentando a eficiência de enzimas, proteínas e carreadores de elétrons; porém em altas concentrações, podem hiperpolarizar membranas, alterando o funcionamento de bombas de ATP, caracterizando flavonoides como tóxicos para as células, causando a redução no crescimento (Almeida 2008; De Martino et al. 2012). Outro efeito da hiperpolarização é a abertura de canais – dependentes de hiperpolarização. Este tipo de canal é classificado como um canal não seletivo de cátions, permeável ao K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Ba^{2+} (Very e Davies, 2000, Hedrich, 2012), podendo causar o desbalanceamento destes elementos.

Assim como os flavonoides, os terpenoides também abrangem uma ampla variedade de substâncias de produtos vegetais (Maróstica Junior, 2006), possuem esqueleto carbonado composto de unidades de isopreno (2-metilbutadieno) e são biossintetizados por duas rotas diferentes, a rota do ácido mevalônico e a rota do metileritritol fosfato (Taiz e Zeiger, 2010).

Na rota do ácido mevalônico, três moléculas de acetil CoA são ligadas, para formar o ácido mevalônico, intermediário de seis carbonos, que é pirofosforilado, descarboxilado e desidratado para produzir o isopentenil difosfato (IPP). O IPP também pode ser formado a partir de intermediário da glicose ou do ciclo de redução fotossintética do carbono, através da rota do metileritritol fosfato, que ocorre nos cloroplastos e outros plastídeos. O gliceraldeído-3-fosfato e dois átomos de carbono derivados do piruvato se combinam para formar um intermediário convertido em IPP. O isopentenil difosfato e seu isômero, o dimetilalil difosfato (DMAPP), unidades pentacarbonadas (isoprenos), se unem para formar moléculas maiores (Taiz e Zeiger, 2010).

Os terpenos são classificados de acordo com o número de isoprenos presentes, chamados de monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos), diterpenos (20 carbonos), triterpenos (30 carbonos) e teraterpenos (40 carbonos). Possuem uma grande importância ecológica atuando na defesa da planta (Viegas Junior, 2003), os monoterpenos atraem polinizadores e têm um papel fungicida (Langenheim, 1994 apud Viegas Junior, 2003). De acordo com Viegas Junior (2003), em mamíferos, os monoterpenos estão envolvidos na estabilização das membranas celulares, rotas metabólicas e reguladores de reações enzimáticas. Os terpenos têm sido alvos de estudos devido a seu desempenho na prevenção de

doenças, sua atividade como inseticidas naturais e agentes antimicrobianos (Maróstica Junior, 2006).

São diversas as espécies de plantas que apresentam atividade alelopática. Maraschin-Silva e Aquila (2006) demonstraram que os extratos aquosos das folhas de *Erythroxylum argentinum*, *Luehea divaricata*, *Myrsine guianensis* e *Ocotea puberula* afetaram a germinação e crescimento inicial de sementes de alface (*Lactuca sativa*). Em estudo realizado por Rozete et al. (2007) foi evidenciado que o extrato aquoso de folhas de alecrim-do-campo (*Bacharis dracunculifolia*) possui efeito inibitório na germinação e no crescimento da raiz de sementes de repolho (*Brassica oleracea*) e de alface (*Lactuca sativa*). Almeida et al. (2007) estudaram o efeito inibitório de extratos de *Byrsonima crassa* na germinação e crescimento inicial de tomate, comparando com os efeitos alelopáticos de substâncias isoladas deste extrato. Ainda, Almeida et al. (2008) demonstraram a atividade de extratos aquosos e metanólicos de folhas de *Leonurus sibiricus* (rubim) na germinação e crescimento de raiz de *Raphanus sativus*, *Lepidium sativus* e *Lactuca sativa*. Santana et al. (2006) constataram efeitos alelopáticos no extrato de *Copaifera langsdorffii* tanto na germinação como no desenvolvimento radicular de sementes de *Lactuca sativa*. Silva et al. (2012) realizou experimentos de pré e pós emergência de sementes de *Lactuca sativa* em solos coletados abaixo de copas de *Copaifera langsdorffii*, em diferentes épocas (seca e úmida), observando que a germinação não foi alterada, porém o crescimento inicial de raiz foi significativamente alterado. O extrato metanólico das folhas de *Caryocar brasiliense* apresentou ação inibitória em diferentes concentrações sobre a germinação de sementes de *Panicum maximum*, com valores de inibição variando de 50 até 75% (Moreira et al., 2009).

Após o sequenciamento dos genomas, a análise de expressão gênica por microarray de DNA, estudos sobre a expressão de genes, indicam alterações no padrão de expressão (aumentando ou diminuindo a quantidade de transcritos) sob condições específicas, que fornecem informações importantes sobre a função do gene e suas interações com vias metabólicas (Brazma et al., 2001). Os primeiros trabalhos na área de alelopatia utilizando técnicas da biologia molecular, realizados por Bais et al. (2003) mostraram que exsudatos de raízes de *Centaurea maculosa* liberam a fitotoxina (-)-catequina a qual é responsável pela inibição da germinação e crescimento de espécies nativas. Ainda, segundo os mesmos autores, em espécies sensíveis, como *Arabidopsis thaliana*, o aleloquímico desencadeia produção de espécies reativas de oxigênio, iniciado no meristema radicular, o que leva a cascata de sinalização por Ca^{2+} levando a alterações na expressão de genes que estão relacionados com diferentes funções fisiológicas. A expressão diferencial ocorre nos genes relacionados com a

morte celular programada e com o estresse oxidativo. Segundo Golisz et al. (2011) a expressão gênica em plantas de *Arabidopsis thaliana*, que haviam sido expostas ao aleloquímico L-DOPA, e analisadas utilizando microarrays de DNA após 6h de exposição, 110 genes foram significativamente super expressos e 69 genes tiveram a expressão significativamente reduzida.

Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench, é um cereal de grande importância econômica, e muito importante na alimentação para muitos países em desenvolvimento, e severamente afetado por plantas daninhas após germinação e durante o desenvolvimento inicial da plântula. Como consequência infestações de plantas daninhas podem levar a uma colheita de péssima qualidade (Pannacci et al., 2010). Para verificar os efeitos alelopáticos, sementes de sorgo podem ser utilizadas, principalmente por apresentarem germinação rápida e uniforme e serem consideradas sensíveis, pois expressam de forma satisfatória os efeitos que compostos secundários podem ter sobre a germinação (Alves et al., 2004), além de ser possível acessar genes em sorgo similares aos genes descritos em trabalhos com *Arabidopsis*, sendo estes prováveis ortólogos. Um gene é ortólogo de um outro, pois eles são genes de espécies diferentes que possuem um ancestral comum, mas apesar da especiação o gene ortólogo permanece bem conservado, portanto a proteína codificada por este código genético mantém suas propriedades e funções. Schon e Einhellig (1984) observaram redução significativa no crescimento de plântulas de sorgo sobre efeito de extrato aquoso de folhas de girassol, junto ao decréscimo do potencial hídrico da folha. Einhellig e Rasmussen (1978), relataram que a germinação e o crescimento de rabanete e sorgo foram inibidas pelo efeito sinérgico da combinação de ácido vanílico e p-hidroxibenzóico.

1.2. Prospecção das espécies sazonalidade ambiental

Técnicas como Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) associadas a Espectrometria de Massa (MS) são ferramentas analíticas eficientes para identificar a presença de compostos naturais em extratos brutos, possibilitando a obtenção do perfil cromatográfico de frações ativas isoladas (Branco e Pizzolatti, 2002). Nos estudos que associam a fitoquímica com os ensaios biológicos, para conhecer a composição dos extratos e associar os efeitos, é necessário fracionar, isolar e/ou identificar a(s) substância(s), ou a classe dos compostos que acarreta(m) o efeito tóxico (Inderjit e Del Moral, 1997) ou benéfico (Macias et al. 1997) dos componentes do metabolismo secundário das plantas.

As condições ambientais existentes no Cerrado, como déficit hídrico e incidência solar, colaboram para o diversificado laboratório químico que sintetiza e seleciona os compostos produzidos por essas plantas. Além destas características ambientais, o Bioma apresenta importante contraste sazonal entre a época seca (abril a setembro) e chuvosa (outubro a março) (Oliveira e Marquis, 2002). A variação na disponibilidade hídrica é um dos fatores que frequentemente apresenta consequências importantes nas concentrações de metabólitos secundários em plantas, e há vários relatos de que estas condições geralmente levam a alteração na produção de vários tipos de metabólitos secundários (Gerherzon, 1984; Waterman e Mole, 1989)

A seca é um dos mais importantes estresses abióticos que influenciam a distribuição de espécies arbóreas e limitam a produtividade dos ecossistemas. Muitas espécies arbóreas desenvolveram mecanismos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos para superar eventual suprimento inadequado de água como mudanças no padrão de crescimento e desenvolvimento de órgãos vegetativos, condutância estomática, potencial osmótico dos tecidos e produção de substâncias do metabolismo secundário (Caruso et al., 2008; Xu et al., 2008).

Exemplos da influência da disponibilidade hídrica na produção de metabólitos secundários são a correlação positiva de alguns dos componentes do óleo essencial de *Santolina rosmarinus* (Palá-Paúl et al., 2001) e a correlação negativa entre a produção de saponinas, como a lemmatoxina em *Phytolacca dodecandra*, com os níveis de precipitação (Ndamba et al., 2004). Em *Hypericum perforatum* há um aumento significativo na concentração de flavonóides, hipericinas e ácido clorogênico nas flores sob condições de estresse hídrico, porém, há um decréscimo na concentração de hiperforinas (Gray et al., 2003). Em *Lippia alba* variações qualitativas e quantitativas em relação ao período de colheita foram realizados e os resultados apresentaram correlação com dados ambientais. O rendimento do óleo essencial variou entre 0,33 e 0,67%. A diversidade dos constituintes químicos aumentou ao longo do ano, sendo 1,8-cineol e linalol os componentes principais (Barros et al., 2009).

Copaifera langsdorffii Desf. (Fabaceae – Caesalpinoideae), conhecida por pau-d'óleo ou copaíba (Figura 1), é uma espécie arbórea ocorrente em diversas fitofisionomias (e.g. mata de galeria, mata mesofítica, cerradão, cerrado, mata seca, entre outros), distribuindo-se em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná (Almeida et al., 1998; Lorenzi, 2002). É uma planta decídua ou semidecídua, heliófita, seletiva xerófila, característica das formações de transição do Bioma Cerrado para a Floresta Latifoliada Semidecídua (Lorenzi, 2002). Possui propriedades medicinais comprovadas como atividades antimicrobiana, anti-

inflamatória, antiulcerogênica, antitumoral e cicatrizante foram relatadas por diferentes autores (Veiga Jr. e Pinto, 2002; Langennhein, 2003). A riqueza química dos extratos de plantas aromáticas e medicinais é reconhecida fonte de compostos biologicamente ativos, sendo que as substâncias alelopáticas podem apresentar também características semelhantes às das substâncias com efeitos terapêuticos (Mathela, 1991; Cutler e Cutler, 1999). É considerada uma espécie que exerce efeito alelopático, interferindo diretamente na germinação de sementes (Santana et al., 2006). É possível observar, que a diversidade de espécies vegetais sob copas de copaíba é baixa, da mesma forma que a frequência de regeneração natural (Cetnarski Filho e Nogueira, 2005), fato que pode estar associado ao comportamento decíduo, perdendo as folhas durante a época seca, provocando acúmulo de serapilheira. Este acúmulo leva a decomposição da serapilheira, um dos mecanismos de liberação de substâncias alelopáticas no solo (Belz, 2007; Bessa et al., 2007).



Figura 1 - *Copaifera langsdorffii* Desf. Fonte: Roberto de Oliveira Portella.

1.3. Expressão gênica e desenvolvimento de raiz

As ferramentas moleculares são fortes aliadas no estudo do modo de ação dos aleloquímicos. O estudo do genoma de *Arabidopsis thaliana* tem ajudado na descoberta de aspectos fisiológicos da atividade fitotóxica. A expressão dos genes pode ser monitorada apontando as alterações causadas pelo aleloquímico na expressão gênica e conseqüentemente a via bioquímica atingida (Belz, 2007).

Após o sequenciamento dos genomas, a análise de expressão gênica por *microarrays* de DNA, tornou-se a fonte mais utilizada para se obter dados do genoma funcional. Estudos de expressão gênica com *microarray*, produzem grande quantidade de dados sobre a expressão de genes, indicando alterações no padrão de expressão (aumentando ou diminuindo a quantidade de transcritos) sob condições específicas e fornecem informações importantes sobre a função do gene e suas interações com vias metabólicas (Brazma et al., 2001).

Trabalhos recentes têm destacado a resposta do transcriptoma de *Arabidopsis* com a exposição de plantas aos aleloquímicos, tais como (-)-catequina (Bais et al., 2003) e *Benzoxazolin 2(3H)-one* (BOA) (Baerson et al., 2005). Resultados obtidos através das técnicas de *microarray* indicam que os aleloquímicos produzem padrões de resposta similares aos que ocorrem durante o estresse biótico e/ou abióticos e a regulação de tais respostas é feita por diferentes conjuntos de genes (Golisz et al., 2008).

O crescimento de raiz quase sempre se mostra mais afetado por aleloquímicos do que o processo de germinação, pois a emergência da radícula é feita à custa de suas reservas sendo, por isso, menos sensível a presença de aleloquímicos do que o desenvolvimento da raiz (Ferreira e Aquila, 2000; Prates et al, 2000). A raiz é um órgão de sustentação das plantas terrestres adaptado à obtenção de água e nutrientes do ambiente. Seus tecidos e tipos celulares surgem do meristema apical com estrutura relativamente simples (Schiefelbein et al., 1997). Uma das características básicas das raízes é seu padrão radial, constituído por camadas concêntricas de tecidos de três tipos fundamentais: a epiderme, o córtex e o tecido vascular. Em um corte transversal da raiz madura se observa, de dentro para fora: o cilindro vascular (protoxilema e protofloema), o periciclo, a endoderme, o córtex e a epiderme (Figura 2). Ao longo de seu eixo apical-basal se distinguem quatro regiões. Na região subapical se localiza a zona meristemática, composta por células pequenas e arredondadas, onde ocorrem os processos de divisão celular. No centro desta região aparece o centro quiescente, composto pelas células iniciais e centrais, que se comporta como um pro meristema (Scheres et al., 1994; Dolan et al., 1993). A próxima zona é a de alongamento (ou expansão celular), na qual não se observa divisão celular, mas o alongamento das células ao longo do eixo apical-basal.

A seguir, a zona de especialização (ou diferenciação), na qual células epidérmicas específicas (tricoblastos) se diferenciam formando pelos radiculares. Por último, existe uma zona de formação de raízes laterais, na qual são gerados novos meristemas (Dolan et al., 1993). A absorção de água pela raiz ocorre prioritariamente na região de diferenciação devido ao aumento da superfície de contato dos pelos radiculares com o ambiente. A água e micromoléculas entram no tecido radicular radialmente, passando pelas células do córtex da raiz, endoderme, periciclo até atingir o xilema (protoxilema e metaxilema) (Taiz e Zeiger, 2010).

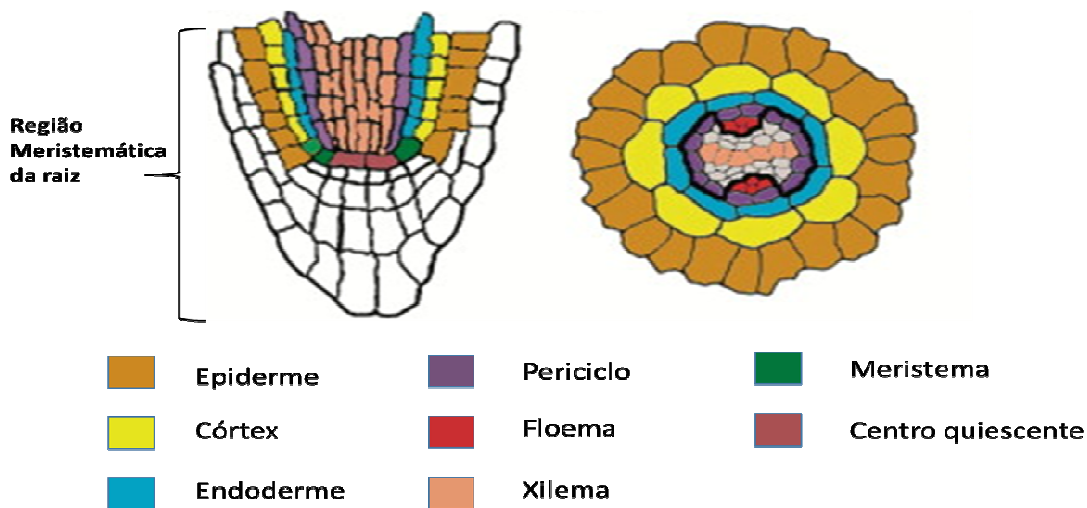


Figura 2 - Padrão dos tecidos observados na raiz de *A.thaliana*. Esquema de um corte longitudinal mostrando o padrão apical-basal e de um corte transversal mostrando o padrão radial. Adaptado de Furuta et al. (2012).

Muitos autores identificaram diferentes genes que regulam o crescimento indeterminado das raízes em *Arabidopsis*. Um desses genes codifica a proteína SHORT-ROOT (SHR). SHR é um fator de transcrição da família GRAS [*GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI)*, *REPRESSOR OF GAI-3 (RGA)*, *SCR*] e um componente chave na rota de desenvolvimento que regula a especificação do grupo de células meristemáticas da raiz, bem como a padronização radial em *Arabidopsis* (Benfey et al., 1993; Nakajima, 2001). Em plantas mutantes sem SHR, raízes primárias são extremamente reduzidas (Figura 3) (Benfey et al., 1993; Scheres et al., 1995; Yu et al., 2010). Estudos mostraram que mutações nos genes SCARECROW (SCR) e SHORT ROOT (SHR) levam a produção de raízes com uma única camada de tecido fundamental no córtex radicular. Em mutantes shr esta única camada de tecido fundamental apresenta características de células corticais e ausência de características

endodérmicas, indicando que SHR é necessário para especificar a identidade da endoderme (Scheres et al., 1995).

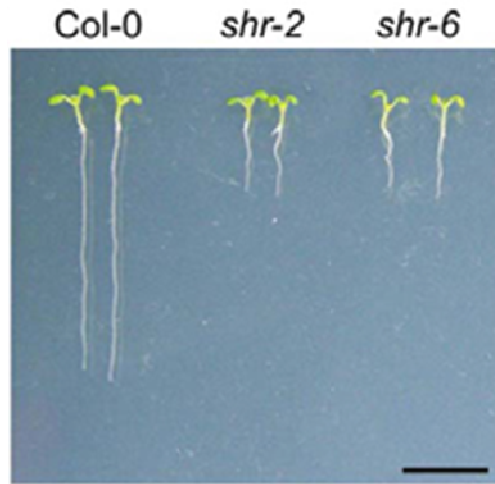


Figura 3 - O crescimento da raiz de plântulas com 7 dias de idade de Col-0 (tipo selvagem), e mutantes *shr-2*, e *shr-6*, ambos mutantes nulos, demonstram crescimento radicular precocemente determinado. Barra = 1 cm. Retirado de Yu et al. (2010).

Membros da classe III de fatores de transcrição (FT) do tipo HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER (HD ZIP III) apresentam os genes REVOLUTA (REV), PHABULOSA (PHB) e PHAVOLUTA (PHV) os quais controlam a formação do meristema apical e lateral (Otsuga et al., 2001; Emery et al., 2003). Também foi observado que os genes da família HD ZIP III são expressos em padrões complementares a família genica KANADI no desenvolvimento de raízes laterais e têm papel funcional na formação deste tipo de raiz (Hawker e Bowman, 2004). Carlsbecker et al (2010) indica que miRNAs se movem para dentro do estelo da raiz e reprimem a expressão de transcritos de HD ZIP III (Figura 4). A expressão deste FT especifica o tipo de xilema, onde altos níveis levam a formação de metaxilema, e baixos níveis, a formação de protoxilema. Especialmente, o aumento da expressão PHB é observada tão logo ocorrem as primeiras alterações morfológicas no periciclo após o início das divisões celulares. A expressão de PHB permanece alta até a emergência da raiz lateral (Hawker e Bowman, 2004). Mutantes sem HD ZIP III não são capazes de produzir células do xilema. Interessantemente, vários membros de famílias gênicas descritas anteriormente estão sujeitos à regulação pós-transcricional via RNAs regulatórios. Transcritos dos genes HD-ZIP III são alvos dos microRNAs 165 e 166 (Juarez et al., 2004).

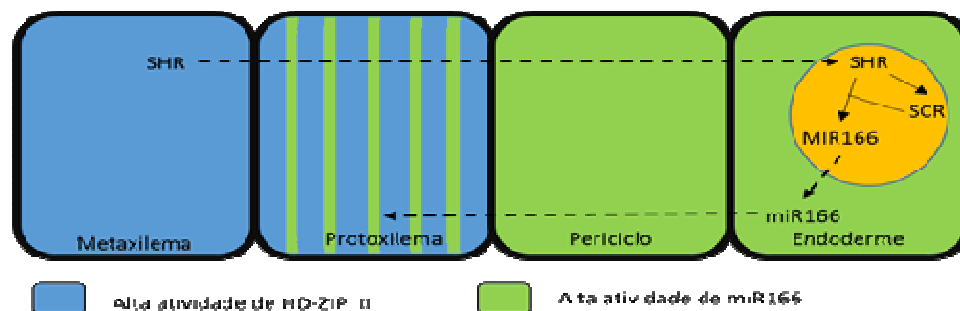


Figura 4 – Mecanismo de regulação fisiológica dos genes SHR, HDZIPIII e do miR166 adaptado de Carlsbecker et al. (2010).

MicroRNAs (miRNA) são pequenos RNAs (sRNAs) endógenos não codificantes de aproximadamente 20 a 22 nucleotídeos que regulam negativamente a expressão gênica em eucariotos de maneira sequência-específica (Zhang et al., 2006; Naqvi et al., 2012). A maioria dos genes de miRNAs em plantas constituem unidades transcricionais independentes, estando sob influência de seus próprios promotores, que são muito similares aos dos genes codificadores de proteínas. Podem então ser controlados por vários fatores de transcrição e por modificações nas cromatinas. Estímulos externos, como componentes bióticos e abióticos levam à modulação dos níveis de expressão dos miRNAs (Naqvi et al., 2012)

A biossíntese de miRNAs é iniciada pela transcrição dos genes *MIR* via a RNA Polimerase II. O transcrito primário (pri-miRNA) é um RNA longo de fita simples e poliadenilado que forma estrutura secundária do tipo *hairpin*. O pri-miRNA é processado via a ação de diferentes enzimas, incluindo a enzima RNase III DICER-LIKE1 (DCL1) e gera o precursor intermediário (pre-miRNA) (Vaucheret, 2006). O pré-miRNA é clivado novamente pela enzima DCL1, gerando um *duplex* imperfeito de RNA (20-22 nt) que contém tanto o miRNA maduro quanto sua fita complementar (miRNA). O *duplex* de RNA é metilado pela enzima HEN1 (Yang et al., 2006) e o miRNA maduro é posteriormente incorporado ao complexo proteico denominado RISC (Complexo de Indução do Silenciamento do RNA) que contém a enzima ARGONAUTA1 (AGO1). AGO1, direcionada pelo miRNA maduro, cliva mRNAs específicos ou promove a repressão da tradução de genes-alvo (Voinnet, 2009) (Figura 5).

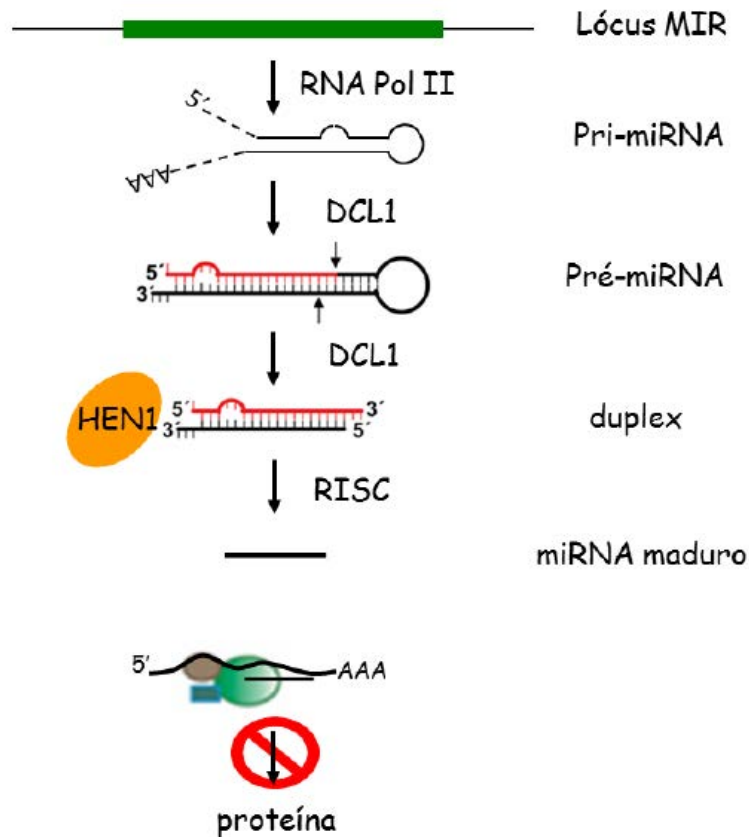


Figura 5 – Modelo da biogênese e ação de microRNAs em plantas.

MicroRNAs e outros RNAs regulatórios desempenham papel crucial em diversos processos biológicos em plantas, incluindo desenvolvimento (Chitwood et al., 2007), sinalização via fitormônios (Achard et al., 2004; Mallory et al., 2005) e resposta a estresses bióticos e abióticos (Lu et al. 2005). Alguns microRNAs foram extensivamente estudados em distintos aspectos do desenvolvimento vegetal. Durante o estabelecimento da dorsoventralidade foliar, por exemplo, miR166 restringe o acúmulo de transcritos dos genes HD-ZIPIII na face superior (adaxial) dos primórdios foliares em desenvolvimento. Essa regulação espacial dos transcritos dos genes HD ZIP III é um fator-chave para o desenvolvimento da lâmina foliar em milho (Nogueira et al. 2007). Zhong e Ye (2007) sugerem que a regulação de HD-ZIP III por miR165 e miR166 é mediada não só pela expressão tecido-específica, mas também por efeitos diferenciais na clivagem dos transcritos alvos. Zhu et al. (2011) observaram que ARGONAUTA10 (AGO10) assim como AGO1 tem grande afinidade com miR166, sequestrando miR166 prevenindo sua incorporação ao complexo AGO1 e a subsequente repressão da expressão dos genes HD-ZIP III em meristema apical. A super expressão do miR166 pode levar a uma retroalimentação negativa, sinalizando para aumento de AGO10 (Zhu et al., 2011; Manavella et al., 2011).

Para todos estes estudos de expressão gênica em condições de desenvolvimento diferenciadas a quantificação de transcritos dos genes alvos pode ser expressa em número absoluto ou relativo. A quantificação absoluta determina quantidade exata de amplicons, através do método da curva padrão, onde se emprega quantidades conhecidas de amostra, enquanto na quantificação relativa utilizadas equações que envolvem o valor de Ct (Threshold Cycle) da amostra, de um calibrador e de um gene normalizador.

O gene normalizador é utilizado como controle interno para normalizar os valores de mRNA e miRNA obtidos, e diminuir efeitos de fatores não biológicos, como variações em passos do procedimento experimental, quantidade inicial de amostra, integridade de RNA, eficiência na síntese de cDNA e diferenças transcricionais em tecidos e células analisados (Expósito-Rodriguez et al., 2008). A expressão deste gene não deve variar em tecidos e células, ou em resposta a um tratamento experimental (Rebrikov e Trofimov, 2006). Como gene normalizador geralmente é utilizado um gene constitutivo ou “housekeeping” (Expósito-Rodriguez et al., 2008). Estes genes geralmente estão envolvidos em processos básicos como manutenção da estrutura das células ou metabolismo primário (Expósito-Rodriguez et al., 2008). Alguns genes foram bastante estudados como bons normalizadores em plantas, como o RNA Ribossomal 18S (rRNA 18S), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), fator de alongamento 1 α (EF-1 α), actina, α tubulina, e β tubulina (Czechowski et al., 2005). Muitas publicações destacam, entretanto, o fato de nenhum gene em particular ser capaz de preencher os critérios de um gene de referência universal. Ou seja, não há gene ideal para normalizar, pois todos são regulados de alguma forma e nenhum é constitutivamente expresso em todos os tipos celulares e sob todas as condições, independentemente das condições experimentais. Portanto, cabe ao investigador identificar e validar o gene mais apropriado para as condições experimentais a utilizar (Bustin et al, 2005).

4. Justificativa

São poucos os estudos realizados sobre atividade alelopática do gênero *Copaifera*. O conhecimento das atividades biológicas de extratos de plantas do gênero *Copaifera* pode esclarecer as relações existentes entre essas plantas e o ambiente em que vivem. O conhecimento da composição química das folhas pode trazer as relações existentes entre os compostos produzidos e as concentrações testadas, indicando respostas de dose-efeito ecologicamente importantes para a dinâmica populacional através dos processos inibitórios e estimulatórios. O estudo de extratos de diferentes épocas com variação da disponibilidade hídrica é importante, pois o processo de produção e liberação de aleloquímicos não é

uniforme e pode variar conforme o ambiente, sazonalidade e a fenologia da espécie (Reigosa et al., 1999; Martins et al., 2006). A liberação de aleloquímicos, principalmente através da decomposição da serapilheira, podem acarretar alterações nas propriedades e características nutricionais do solo e também nas populações e/ou atividade de organismos que habitam o rizosfera (Rizvi e Rizvi, 1992; Ferreira e Aquila, 2000). Por estas razões a alelopatia assume um papel importante nos ecossistemas naturais e agrossistemas, pois influencia a estrutura, composição e dinâmica de comunidades vegetais (Gniazdowska e Bogatek, 2005). Ainda, uma vez esclarecida tais relações biológicas, alguns extratos e frações enriquecidas obtidas através das folhas, poderão ser utilizados como compostos alternativos aos herbicidas sintéticos na agricultura. A substituição de compostos nocivos ao ambiente pelos extratos vegetais pode diminuir o impacto ambiental mantendo o equilíbrio biológico, preservando o solo e os ecossistemas.

5. Referências

ACHARD, P.; HERR, A.; BAULCOMBE, D.C.; HARBERD, N.P. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated MicroRNA. **Development**, v.131, p.3357-3365, 2004.

ALMEIDA, L.F.R.; SANOMIYA, M.; RODRIGUES, C.M.; DELACHIAVE, M.E.A.; MANCINE, E.; VILEGAS, W.; DE FEO, V. In vitro allelopathic effect of extracts from *Leonurus sibiricus* leaves. **Journal Plant Interactions**. v.3,n.1,p.38-49, 2008.

ALMEIDA, L.F.R.; SANOMIYA, M.; RODRIGUES, C.M.; DELACHIAVE, M.E.A.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; DE FEO, V. In vitro allelopathic of extracts and amenthoflavone from *Byrsonima crassa*. **Journal Plant Interactions**. v.2, n.2, p.121-124, 2007.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. 1ª Ed. Embrapa: Planaltina. 1998, 143p.

ALVES, M.C.S.; MEDEIROS, FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S.B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.39, p.1083-1086, 2004.

BAERSON, S.R.; COOK, D.; DAYAN, F.E.; RIMANDO, A.M.; PAN, Z.; DUKE, S.O. **The use of functional genomics to advance allelopathic science – investigating sorgoleone**

biosynthesis as an example. In FOURTH WORLD CONGRESS ON ALLELOPATHY, Proceedings ... International Allelopathy Society. 2005, pp. 191–196.

BAIS, H.P.; VEPACHEDU, R.; GILROY, S.; CALLAWAY, R.M.; VIVANCO, J.M. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules an genes to species interactions. **Science** v.301, p. 1377–1380, 2003.

BARROS, F.M.C.; ZAMBARDA E.O.; HEINZMANN, B.M.; MALLMANN, C.A. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**. v.4, PP.861-867, 2009.

BENINGER, C.W.; HALL, J.C. Allelopathic activity of luteolin 7-O- β -glucuronide isolated from *Chrysanthemum morifolium* L. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.33, p.103–111, 2005.

BELZ, R.G. Allelopathy in crop/weed interactions – an update. **Pest Management Science**. v.63, p.308–326, 2007.

BENFEY, P.N.; LINSTAD, P.J.; ROBERTS, K.; SCHIEFELBEIN, J.W.; HAUSER, M.T.; AESCHBACHER, R.A. Root development in Arabidopsis: Four mutants with dramatically altered root morphogenesis. **Development**. v.119, p.57-70, 1993.

BESSA, T.; HERNANDE-TERRONES, M.G; SANTOS, D.Q. Avaliação fitoquímica e identificação de metabólitos secundários de raiz de *Cenchrus echinatus*. **Horizonte Científico** v.1, 2007.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M.; Flavonoids as antioxidants: Determination of radical scavenging efficiencies. **Methods Enzymology**, v.186, p.343–355, 1990.

BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M.G. CGAR e CGAR-EM na análise dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Sabastiania argutidens* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v.25, p.15-19, 2002.

BRAZMA, A.; HINGAMP, P.; QUACKENBUSH, J.; SHERLOCK, G; SPELLMAN, P; STOECKERT, C.; AACH, J.; ANSORGE, W.; BALL, C.A.; CAUSTON, H.C.; GAASTERLAND, T.; GLENISSON, P; HOLSTEGE, F.C.P; KIM, I.F; MARKOWITZ, V;

MATESE, J.C.; PARKINSON, H.; ROBINSON, A.; SARKANS, U.; SCHULZE-KREMER, S.; STEWART, J.; TAYLOR, R.; VILO, J.; VINGRON, M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. **Nature Genetics**, v.29, p.365 – 371, 2001.

BUER, C.S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M.A. Flavonoids: new roles for old molecules **Journal of Integrative Plant Biology**, v.52, n.1, p.98–111, 2010.

BUSA, W.B.; NUCCITELLI, R. Metabolic regulation via intracellular pH. **American Journal of Physiology**, v.246, p.409-38, 1984.

BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**. v.29, p.23-39, 2002.

CARLSBECKER, A.; LEE, J.; ROBERTS, C.J.; DETTMER, J.; LEHESRANTA, S.; ZHOU, J.; LINDGREN, O.; MORENO-RISUENO, M.A.; VATE'N, A.; THITAMADEE, S.; CAMPILHO, A., SEBASTIAN, J.; BOWMAN, J.L., HELARIUTTA, Y.; BENFEY, P.N. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. **Nature**, v. 465, p. 316-321, 2010.

CARUSO, A.; CHEFDOR, F.; DEPIERREUX, C.; DELMOTTE, F.M.; KAHLEM, G.; MORABITO, D. Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.165 p.932-941, 2008.

CETNARSKI FILHO R.; NOGUEIRA, A.C. Influência da temperatura na germinação de diásporos de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (canela-sassafrás). **Ciência Florestal**, v.5, p.191-198, 2005.

CHITWOOD, D.H.; GUO, M.; NOGUEIRA, F.T.S.; TIMMERMANS, M.C.P. Establishing leaf polarity: the role of small RNAs and positional signals in the shoot apex. **Development**, v.134, p.813-23, 2007.

CUTLER, H.G.; CUTLER, S.J. Agrochemicals and Pharmaceuticals: The connection. In: . **Biologically active natural products: Agrochemicals**. Boca Raton, Florida, 1999. p.1-14.

- CZECHOWSKI, T.; STIT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M.K.; SCHEIBLE, W. Genome-wild identification and testing of superior reference-genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.139, p.5-17, 2005.
- DE MARTINO, L.; MENCHERINI, T.; MANCINI, E.; AQUINO, R.P.; ALMEIDA, L.F.R.; DE FEO, V. b In Vitro Phytotoxicity and Antioxidant Activity of Selected Flavonoids. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p.5406-5419, 2012.
- DOLAN, L.; JANMAAT, K.; WILLEMSSEN, V.; LINSTEAD, P.; POETHIG, S.; ROBERTS, K.; SCHERES, B. Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. **Development**, v.119, p.71–84, 1993.
- EINHELLIG, F.A.; RASMUSSEN, J.A. Synergistic inhibitory effects of vanillic and p-Hydroxybenzoic acids on radish and grain sorghum. **Journal of Chemical Ecology**, v.4, n.4, p.425-436.
- EMERY, J.F.; FLOYD, S.K.; ALVAREZ, J.; ESHED, Y.; HAWKER, N.P.; IZHAKI, A.; BAUM, S.F.; Bowman JL. Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. **Current Biology**, v.13, p.1768-1774, 2003.
- EXPÓSITO-RODRIGUEZ, M.; BORGES, A.A.; BORGEZ-PÉREZ, A.; PÉREZ, J.A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, v.8, p.131, 2008.
- FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.175-204, 2000.
- GERSHENZON, J. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. **Recent Advances in Phytochemistry**, v.18, p.273–320, 1984.
- GNIAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants: Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, n. 3, p. 395-407, 2005.
- GILLIES, R.J.; DEAMER, D.W. Intracellular pH changes during the cell cycle in *Tetrahymena*. **Journal of Cellular Physiology**, v.100, n.1, p.23-32, 1979.
- GOLISZ, A.; SUGANO, M.; HIRADATE, S.; FUJII, Y. Microarray analysis of *Arabidopsis* plants in response to allelochemical L-DOPA. **Planta**, v.233, n.2, p.231–240, 2011.

- GOLISZ, A.; SUGANO, M.; FUJII, Y. Microarray expression profiling of *Arabidopsis thaliana* L. in response to allelochemicals identified in buckwheat. **Journal of Experimental Botany**, v.59, n.11, p.3099–3109, 2008
- HARBORNE, J.B. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986, London: Chapman e Hall. **Phytochemical Analysis**, v.6, n.1, p.589-618, 1995.
- HARBONE, J.B. **Chemotaxonomy of the Leguminosae**. In: CODY, V.; MIDDLETON, E.; HARBONE, J.B. (Eds.), **The Flavonoids Advances in Research Since 1980**. London: Chapman e Hall. 1988. p.367-462.
- HAWKER, N.P.; BOWMAN, J.L. Roles for Class III HD-Zip and KANADI Genes in *Arabidopsis* Root Development. **Plant Physiology**, v.135, n.4, p.2261–2270, 2004.
- HEDRICH, R. Ion channels in plants. **Physiological Reviews**, v.92, n.4, p.1777–1811, Oct 2012.
- HOAGLAND, R.E.; WILLIAMS, R.D. Bioassays-useful tools of the study of allelopathy. In: MACIAS, F.A. et al. (Eds.) **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, Florida: CRC Press. 2004. p.315-41.
- INDERJIT, CALLAWAY, R.M.; VIVANCO, J.M. Can plant biochemistry contribute to understanding of invasion ecology? **Trends in Plant Science**, v.11, n.11, p.574-580, 2006.
- INDERJIT; DEL MORAL, R. Is separating resource competition from allelopathy realistic? **The Botanical Review**, v.63, n. 3, p.221-230, Jul-Sep 1997.
- JUAREZ, M.T.; KUI, J.S.; THOMAS, J.; HELLER, B.A.; TIMMERMANS, M.C.P. microRNA mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. **Nature**, v.428, p.84-88, 2004.
- KÜHNAU, J. The Flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World review of nutrition dietetics**, v.24, p.117-190, 1976.
- KURKDJIAN, A.; GUERN, J. Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, p.271-303, 1989.

LANGENHEIM, J.H. **Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology and Ethnobotany**. Cambridge: Timber Press. 2003. 378p.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa/SP: Plantarum. 2ª Ed. 2002, 349p.

LU, S.; SUN, Y.H.; SHI, R.; CLARCK, C.; LI, L.; CHIANG, V.L. Novel and mechanical stress responsive miRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.17, p.2186-2203, 2005.

MACIAS FA.; MOLINILLO, J.M.G.; TORRES, A.; VARELA, R.M.; CASTELLANO, D. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. **Phytochemistry**, v.45, n.4, p.683–687, 1997.

MALLORY, A.C.; BARTEL, D.P.; BARTEL, B. MicroRNA directed regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. **The Plant Cell**, v.17, n.5, p.1360-1375, 2005.

MANAVELLA, P.A.; WEIGEL, D.; WU, L. Argonaute10 as a miRNA Locker. **Cell**, v.145, p.173–174, 2011.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M.E.A. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **Revista Árvore**, v.30, n.4, p.547-555, 2006.

MARÓSTICA JUNIOR, M.R. **Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais**. 2006. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas -SP. 2006.

MATHELA, C.S. **Allelochemicals in Medicinal and Aromatic Plants**. In: NARWAL, S.S.; TAURO, P. (Eds.) Allelopathy in Agriculture and Forestry. Jodhpur, India: Scientific Publishers, 1991, p.213-228.

MOREIRA, P.F.S.D.; SOUZA, D.R.; TERRONES, M.G.H. Avaliação do potencial alelopático do extrato metanólico obtido das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi) na inibição do desenvolvimento da raiz em sementes de *Panicum maximum*. **Bioscience Journal**, v.24, n.3, p.74-79, 2008.

- NAQVI, A.R., SARWAT, M., HASAN, S., ROYCHODHURY, N. Biogenesis, functions and fate of plant microRNAs. **Journal Cell Physiology**. v.227, n.9, p. 3163-8, 2012
- NAKAJIMA, K.; SENA, G.; NAWY, T.; BENFEY, P.N. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. **Nature**, v.413, p.307–311, 2001.
- NDAMBA, J.; LEMMICH, E.; MØLGAARD, P. Investigation of the diurnal, ontogenetic and seasonal variation in the molluscicidal saponin content of *Phytolacca dodecandra* aqueous berry extracts. **Phytochemistry**, v.35, pp.95–99, 1994.
- NOGUEIRA, F.T.S.; MADI, S.; CHITWOOD, D.H.; JUAREZ, M.T.; TIMMERMANS, M.C.P. Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. **Genes & Development**, v.21, p.750-755, 2007.
- OHORI-IHARA Y.; NAGANO, M.; MUTO, S.; UCHIMIYA H.; KAWAIYAMADA, M. Cell death suppressor *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 is associated with calmodulin binding and iron homeostasis. **Plant Physiology**, v.143, p.650-60, 2007.
- OLIVEIRA P.S.; MARQUIS, R.J. **The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna**. Columbia University Press: New York. 1^aEd. 2002. 289p.
- OTEIZA, P.I.; ERLEJMAN, A.G.; VERSTRAETEN, S.V.; KEEN, C.L.; FRAGA, C.G. Flavonoid–membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? **Clinical & Developmental Immunology**, v.12, n.1, p.19-25, 2005.
- OTSUGA, D.; DEGUZMAN, B.; PRIGGE, M.J.; DREWS, G.N.; CLARK, S.E. REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. **The Plant Journal**, v.25, n.2 p.223-236, Jan 2001.
- PALÁ-PAÚL, J.; PÉREZ-ALONSO, M. J.; VELASCO-NEGUERUELA, A.; PALÁ- PAÚL, R.; SANZ, J.; CONEJERO, F. Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *Rosmarinifolia*. **Biochemichal Systematics and Ecology**, v.29, pp.652-663, 2001.
- PANNACCI, E.; BARTOLINI, S.; COVARELLI G. Chemical weed control in biomass sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Agricultural Segment**, v.1, n.1, 2010

- PARVEZ M.M.; TOMITA-YOKOTANI, K.; FUJJI, Y.; Konishi, T.; Iwashina, T. Effects of quercetin and its seven derivatives on the growth of *Arabidopsis thaliana* and *Neurospora crassa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.631–635, 2004.
- PEER, W.A.; MURPHY, A.S. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? **Trends in Plant Science**, v.12, n.12, p.556–563, Dec 2007.
- PIETTA, P.G.; SIMONETTI, P. **Antioxidant Food Supplements in Human Health**. San Diego: Academic Press, 1999, p.283-308.
- PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, n.1, p.45-61, May 2002.
- PRATES, H.T.; PAES, J.M.V.; PIRES, N.M.; PEREIRA FILHO, I.A.; MAGALHÃES, P.C. Efeito do extrato aquoso de *Leucena* na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 909-14, 2000.
- PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. **The Science of allelopathy**, Nova York: John Wiley e Sons. 1986. 317p.
- RAVEN, J.A.; SMITH, F.A. Significance of hydrogen ion movement in plant cells. **Canadian Journal of Botany**, v.52, n.5, p.1035-1049, 1974.
- REBRIKOV, C.V.; TROFIMOV, D.Y. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.42, n.5, p.455-463, 2006.
- RICE, E.L. **Allelopathy**. 2ª Ed. Orlando, Florida: Academic Press. 1984. 422p.
- RICE – EVANS, C.A.; PACKER, L. **Flavonoids in health and disease**. New York: Marcel Dekker. 1998. p.447-467.
- RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. **Allelopathy: Basic and Applied aspects**. London: Chapman e Hall. 1992. 480p.
- ROOS, A.; BORON, W.F. Intracellular pH. **Physiological Reviews**, v.61 n.2, p.269-434, 1981.
- ROZETE, M.B.V.; OLIVEIRA, P.A.; GUSMAN, G.S.; VALENTIM, J.M.B.; VESTENA, S.; BITTENCOURT, A.H.C. Avaliação do Efeito Alelopático de Extratos Aquosos de *Bacharis*

dracunculifolia DC. Sobre a Germinação e o Crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Brassica oleraceae* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p. 513-515, Jul 2007.

SANTANA, D.G.; RANAL, M.A.; MUSTAFA, P.C.V.; SILVA, R.M.G. Germination measurements to evaluate allelopathic interactions. **Allelopathy Journal**, v.17, n.1, 43-52, 2006.

SCHERES, B.; WOLKENFELT, H.; WILLEMSSEN, V.; TERLOUW, M.; LAWSON, E.; DEAN, C.; WEISBEEK, P. Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. **Development**, 120, p. 2475-2487, 1994.

SCHERES, B.; DI LAURENZIO, L.; WILLEMSSEN, V.; HAUSER, M.T.; JANMAAT, K.; WEISBEEK, P.; BENFEY, P.N. Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. **Development**, v.121, p.53-62, 1995.

SCHIEFELBEIN, J.W., MASUCCI, J.D., AND WANT, H. Building a Root: The Control of Patterning and Morphogenesis during Root Development. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1089-1098.
SCHON, M.K.; EINHELLIG, F.A. Allelopathic Effects of Cultivated Sunflower on Grain *Sorghum*. **Botanical Gazette**, v.143, n.4, p.505-510, 1982.

SILVA, R. M. G.; SANTOS, V.H.M.; BORGES, F. M.; MELO, F. F. Q.; SILVA, L P. Potencial alelopático e levantamento do banco natural de sementes em amostras de solo coletadas sob a copa de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 641-653, 2012.

SMITH, F.A.; RAVEN, J.A.; Intracellular pH and its regulation. **Annual Review of Plant Physiology**, v.30, p.289-311, 1979.

TAIZ L; ZEIGER E; **Plant physiology**. 5ª Ed. Sinauer Associates, Inc.; Fifth edition. 2010. 820p.

TAYLOR, L.P.; GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. **Current Opinion Biology**. v.8, p.317-323, 2005.

VARKONYI-GASIC, E.; WU, R.; WOOD, M.; WALTON, E.F.; HELLENS, R.P. A highly sensitive RTPCR method for detection and quantification of microRNAs. **Plant Methods**, v. 3, p.12, 2007.

- VAUCHERET H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. **Genes Development**, v.20, p.759-771, 2002.
- VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO. A.G. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v.25, n.2, p.237-286, 2002.
- VERY, A.A.; DAVIES, J.M. Hyperpolarization-activated calcium channels at the tip of *Arabidopsis* root hairs. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.97, n 17, p.9801–9806, Aug 2000.
- VIEGAS JUNIOR C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v.26, n.3, p.390-400, 2003.
- VOINNET, O. Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. **Cell**, v.136, p.669–687, 2009.
- WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**, 1ªEd., Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1994, 356p.
- WILHELM FILHO, D.; SILVA, E.L.; BOVERIS, A. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. In: CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. **Flavonoides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas**. (Eds.). Ed. Argos: Chapecó/SC. 2001. p. 317-334.
- WILLIAMS, C.A.; GRAYER, R.J. Anthocyanins and other flavonoids. **Natural Product Reports**, v.21, n.4, p.539–573, 2004.
- XU, X.; YANG, F.; XIAO, X.; SHANG, S.; KORPELAINEN, H.; LI, C. Sex-specific responses of *Populus cathayana* to drought and elevated temperatures. **Plant Cell Environmental**, v. 31, p. 850-860, 2008.
- YANG, Z.Y.; EBRIGHT, Y.W.; YU, B.; CHEN, X.M. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 2, p. 667-657, 2006.
- YANG, K.; LAMPRECHT, S.A.; LIU, Y. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. **Carcinogenesis**, v.21, p.1655-1660, 2000.

YU, N.; CAI, W.J.; WANG, S.; SHAN, C.M.; WANG, L.J.; CHEN, X.Y. Temporal control of trichome distribution by microRNA 156 – Targeted SPL Genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, v. 22, n.7, p. 2322-2335, 2010.

ZHONG, R.; YE, Z.H. Regulation of cell wall biosynthesis. **Current Opinion Plant Biology**, v.10, p.564-572, 2007.

ZHU, H.; HU, F.; WANG, R.; ZHOU, X.; SZE, S.H.; LIOU, L.W.; BAREFOOT, A.; DICKMAN, M.; ZHANG, X. Arabidopsis Argonaute10 Specifically Sequesters miR166/165 to Regulate Shoot Apical Meristem Development. **Cell**, v.145, n.2, p.242–256, 2011.

Artigo científico

Efeito da sazonalidade em extratos orgânicos de *Copaifera langsdorffii* Desf. na expressão de genes de raízes de sorgo

Seasonality effects in organic extracts from *Copaifera langsdorffii* in genes expression in sorghum roots.

Danilo Miralha Franco¹, Luiz Fernando Rolim de Almeida¹

1- Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Botânica, Botucatu, SP, Brazil.

Autor correspondente (francodm@ibb.unesp.br)

Distrito de Rubião Junior, s/nº

Botucatu-SP

CEP: 18618-000

Resumo: Foi avaliado o potencial alelopático de extratos orgânicos de folhas de *Copaifera langsdorffii* coletadas em épocas seca e úmida, a fim de avaliar o índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular e o padrão de expressão gênica (SHR, miRNA 166 e FT HDZIP III – PHB, PHV e REV) e características fenotípicas de plântulas de *Sorghum bicolor*. A comparação do perfil fitoquímico observado nos cromatogramas, não indicam modificações qualitativas nos extratos coletados em diferentes épocas. A intensidade de absorção de UV dos picos presentes nos cromatogramas possibilitaram identificar a presença de flavonoides e ácidos fenólicos nos extratos. A velocidade de germinação diminuiu, porém o número de sementes germinadas não foi afetado. O crescimento inicial de raiz se mostrou bastante afetado por todas as doses de extrato testadas, tanto de extratos de época seca quanto úmida. A expressão gênica se mostrou bastante alterada em relação ao controle, onde SHR e miRNA 166 apresentaram grande aumento na expressão, sendo este aumento maior em raízes tratadas com extrato de época úmida. Já os fatores de transcrição HD ZIP III (PHV, PHB e REV) apresentaram um aumento na expressão em raízes tratadas por ambos extratos, porém maior em raízes tratadas com extrato de época seca o aumento foi maior, principalmente em PHB. Esse padrão de expressão pode explicar os resultados morfológicos observados, onde raízes tratadas com extrato de época úmida ficaram fortemente reduzidas. Já o extrato de época de seca apresentou raízes mais longas que as raízes tratadas por extrato de época úmida, porém com maior número de raízes laterais. Extratos de diferentes épocas do ano apresentam atividade inibitória no crescimento de raiz, no entanto os alvos moleculares alterados são distintos. Alterações sutis na composição química dos extratos podem ser as responsáveis pelas diferenças nas expressões gênicas encontradas em raiz de sorgo.

Palavras-chave: perfil químico, alelopatia, SHR, miRNA 166, HD-ZIP III

Abstract: We evaluated the allelopathic potential of organic extracts of leaves *Copaifera langsdorffii* collected in dry and wet seasons, to evaluate the germination speed index (GSI), root growth and the pattern of gene expression (SHR, miRNA 166 and FT HDZIP III - PHB, PHV and REV) and phenotypic characteristics of seedlings of *Sorghum bicolor*. A comparison of phytochemical profile observed in the chromatograms indicates no qualitative changes in the extracts collected at different times. The intensity of UV absorption peaks present in the chromatogram possible to identify the presence of flavonoids and phenolic acids in the extracts. The germination rate decreased, but the number of germinated seeds was not affected. The initial root growth proved quite affected by all extract doses tested both extracts as wet dry season. Gene expression showed significantly changed in relation to the control, where SHR and 166 miRNA showed a large increase in expression, and this increase was greater in roots treated with extract of wet season. Since the transcription factors ZIP III HD (PHV, PHB and REV) showed an increased expression in roots treated with both extracts, but higher in roots treated with extract of the dry season increase was higher, mainly PHB. This pattern of expression may explain the observed morphological results, where roots treated with extract of wet season were greatly reduced. Already extract dry season had longer roots than roots treated with extract wet season, but with a higher number of lateral roots. Extracts of different seasons show inhibitory activity in root growth, although the altered molecular targets are distinct. Subtle changes in the chemical composition of the extracts may be responsible for differences in gene expression found in sorghum root.

Key words: chemistry profile, allelopathy, SHR, miRNA 166, HD-ZIP III

1. Introdução

As condições ambientais existentes no Cerrado, como déficit hídrico e incidência solar, colaboram para o diversificado laboratório químico que sintetiza e seleciona os compostos produzidos por essas plantas. Além destas características ambientais, o Bioma apresenta importante contraste sazonal entre a época seca (abril a setembro) e chuvosa (outubro a março) (Oliveira e Marquis, 2002). A variação na disponibilidade hídrica é um dos fatores que frequentemente apresenta consequências importantes nas concentrações de metabólitos secundários em plantas, e há vários relatos de que estas condições geralmente levam a alteração na produção de vários tipos de metabólitos secundários (Gerherzon, 1984; Waterman e Mole, 1989).

Copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.), é uma espécie arbórea ocorrente em diversas fitofisionomias (e.g. mata de galeria, mata mesofítica, cerradão, cerrado, mata seca, entre outros) (Almeida et al., 1998; Lorenzi, 2002). É uma planta decídua ou semidecídua, heliófita, seletiva xerófita, característica das formações de transição do Bioma Cerrado para a Floresta Latifoliada Semidecídua (Lorenzi, 2002). Possui propriedades medicinais comprovadas como atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antiulcerogênica, antitumoral e cicatrizante foram relatadas por diferentes autores (Veiga Jr. e Pinto, 2002; Langennhein, 2003). A riqueza química dos extratos de plantas aromáticas e medicinais é reconhecida fonte de compostos biologicamente ativos, sendo que as substâncias alelopáticas podem apresentar também características semelhantes às das substâncias com efeitos terapêuticos (Mathela, 1991; Cutler e Cutler, 1999). É considerada uma espécie que exerce efeito alelopático, interferindo diretamente na germinação de sementes (Santana et al., 2006). É possível observar, que a diversidade de espécies vegetais sob copas de copaíba é baixa, da mesma forma que sua frequência de regeneração natural (Cetnarski Filho e Nogueira, 2005), fato que pode estar associado ao hábito decíduo com a queda das folhas durante a época seca, provocando acúmulo de serapilheira. Este acúmulo leva a decomposição da serapilheira, um mecanismo de liberação de substâncias alelopáticas no solo (Belz, 2007; Bessa et al., 2007).

A identificação de substâncias ativas atuando como aleloquímicos vem sendo amplamente estudada fornecendo dados importantes sobre a diversidade química das plantas. Os mecanismos de ação dos aleloquímicos envolvem inúmeros processos bioquímicos e fisiológicos regulados por diferentes conjuntos de genes (Achard et al., 2004; Mallory et al., 2005). Os principais metabólitos secundários liberados pelas plantas que atuam como compostos aleloquímicos são os terpenoides, compostos fenólicos e alcaloides (Rizvi e Rizvi, 1992).

As atividades biológicas desempenhadas pelos flavonoides que mais se destacam são suas atividades antioxidantes, que podem ser demonstradas através da limitação da produção de espécies reativas de oxigênio e/ou eliminação dela (Rice-Evans e Packer, 1998; Bais et al., 2003; Taylor e Grotewold, 2005; Peer e Murphy, 2007). As propriedades antioxidantes captam radicais livres, como grupos hidroxilas e superóxido, altamente reativos e relacionados com o início da cadeia de peroxidação lipídica (Pace-Asciak et al., 1995). No meio intracelular, flavonoides assumem carga negativa em pH neutro e podem hiperpolarizar membranas, alterando o funcionamento de bombas de ATP, caracterizando flavonoides como tóxicos para as células, causando a redução no crescimento (Almeida, 2008; De Martino et al., 2012). Muitos autores relatam que o arranjo do anel B dos flavonoides é provavelmente responsável pela atividade alelopática e a relação estrutura-atividade está relacionada com a fitotoxicidade destes compostos (Macias et al, 1997; Bais et al., 2003; Parvez et al., 2004; Beninger e Hall, 2005; Almeida, 2008; De Martino et al., 2012).

As ferramentas moleculares são fortes aliadas no estudo do modo de ação dos aleloquímicos. O estudo do genoma de *Arabidopsis thaliana* tem ajudado muito na descoberta de aspectos fisiológicos da atividade fitotóxica. A expressão dos genes pode ser monitorada apontando as alterações causadas pelo aleloquímico na expressão gênica e conseqüentemente a via fisiológica atingida (Belz, 2007).

O crescimento de raiz quase sempre se mostra mais afetado por aleloquímicos do que o processo de germinação, pois a emergência da radícula é feita à custa de suas reservas sendo, por isso, menos sensível a presença de aleloquímicos do que o desenvolvimento da raiz (Ferreira e Aquila, 2000; Prates et al, 2000). Santana et al. (2006) constataram efeitos alelopáticos no extrato de *Copaifera langsdorffii* tanto na germinação como no desenvolvimento radicular de sementes de *Lactuca sativa*. Silva et al. (2012) realizou experimentos de pré e pós emergência de sementes de *Lactuca sativa* em solos coletados abaixo de copas de *Copaifera langsdorffii*, em diferentes épocas (seca e úmida), observando que a germinação não foi alterada, porém o crescimento inicial de raiz foi significativamente alterado. O extrato metanólico das folhas de *Caryocar brasiliense* apresentou ação inibitória em diferentes concentrações sobre a germinação de sementes de *Panicum maximum*, com valores de inibição variando de 50 até 75% (Moreira et al., 2009).

Muitos autores identificaram diferentes genes que regulam o crescimento indeterminado das raízes em *Arabidopsis*. Um destes genes codifica a proteína SHORT-ROOT (SHR), um fator de transcrição da família GRAS [*GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI)*, *REPRESSOR OF GAI-3 (RGA)*, *SCR*] e componente chave no caminho de

desenvolvimento que regulam a especificação do grupo de células meristemáticas da raiz, bem como a padronização radial em *Arabidopsis* (Benfey et al., 1993; Nakajima 2001). Em plantas mutantes sem o gene *SHR*, raízes primárias são extremamente reduzidas (Benfey et al., 1993; Scheres et al., 1995). Membros da classe III de fatores de transcrição do tipo HD-ZIP III; *REVOLUTA*, *PHABULOSA* e *PHAVOLUTA*; controlam a formação do meristema apical e lateral (Otsuga et al., 2001; Emery et al., 2003). A expressão destes fatores de transcrição especifica o tipo de xilema, onde altos níveis levam a formação de metaxilema, e baixos níveis, a formação de protoxilema (Carlsbecker et al., 2010). Especialmente, o aumento da expressão *PHB* é observada tão logo ocorrem as primeiras alterações morfológicas no periciclo após o início das divisões celulares. A expressão de *PHB* permanece alta até a emergência da raiz lateral (Hawker e Bowman, 2004). Vários membros de famílias gênicas descritas anteriormente estão sujeitos à regulação pós-transcricional via RNAs regulatórios. Transcritos dos genes HD-ZIP III são alvos dos microRNAs 165 e 166 (Juarez et al., 2004).

Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench, é um cereal de grande importância econômica, representa uma cultura muito importante na alimentação nos países em desenvolvimento e é severamente afetado por plantas daninhas após germinação e durante o desenvolvimento inicial da plântula. Como consequência infestações de plantas daninhas podem levar a colheitas de péssima qualidade (Pannacci et al., 2010). Para verificar os efeitos de alelopatia, sementes de sorgo podem ser utilizadas, principalmente por apresentarem germinação rápida e uniforme e serem consideradas sensíveis, pois expressam de forma satisfatória os efeitos que compostos secundários podem ter sobre a germinação (Alves et al., 2004), além de ser possível acessar em sorgo prováveis genes ortólogos em *Arabidopsis*, genes com semelhança estrutural e que expresse a mesma proteína (Paterson et al., 2000).

A sazonalidade influencia no perfil químico e nas atividades biológicas de extratos orgânicos utilizados em experimentos de atividade alelopática. As atividades biológicas no crescimento de raiz ocorrem ao nível morfológico, alterando comprimento de raiz, mas também pode ocorrer ao nível molecular. Os alvos moleculares responsáveis pela identificação celular no meristema radicular podem ser utilizados na avaliação e comprovação da atividade alelopática como complementos da análise morfológica.

Desta forma, o trabalho teve como objetivo, comparar os perfis químicos de extratos de folhas coletadas ao final da época úmida e ao final da época seca; analisar o efeitos dos extratos no índice de velocidade de germinação (IVG), nos níveis de expressão gênica de

SHR, HD ZIP III e miR166 e as alterações morfológicas e/ou fenotípicas em raízes de sorgo submetidos em diferentes tipos de extratos.

2. Materiais e métodos

2.1. Coleta de material vegetal

Folhas de *C. langsdorffii* foram coletadas na fitofisionomia Cerrado *strictu sensu* Ribeiro *et al.* (2001), localizada na Estrada do Rio Bonito, (22°42'07.82"S 48°20'28.65"O) a 511m de altitude. As folhas foram coletadas em duas épocas distintas, com maior disponibilidade hídrica (época úmida) e outra com menor disponibilidade hídrica (época de seca) (Figura 6), a partir de 5 indivíduos localizados no fragmento de Cerrado. Em seguida foram coletadas amostras para identificação botânica e enviadas ao Herbário "Irina D. Gemtchujnicov" (BOTU) da UNESP de Botucatu onde recebeu o número de identificação 28515.

Parâmetros como conteúdo relativo de água (RWC), potencial água das folhas e do solo e condutância estomática (Tabela 1) foram monitorados antes da coleta de cada época para verificar a influência da variação da disponibilidade hídrica nas respostas fisiológicas da espécie. Estes dados indicam o status hídrico da planta e auxiliam na compreensão da dinâmica sazonal do ambiente e seus efeitos no metabolismo vegetal.

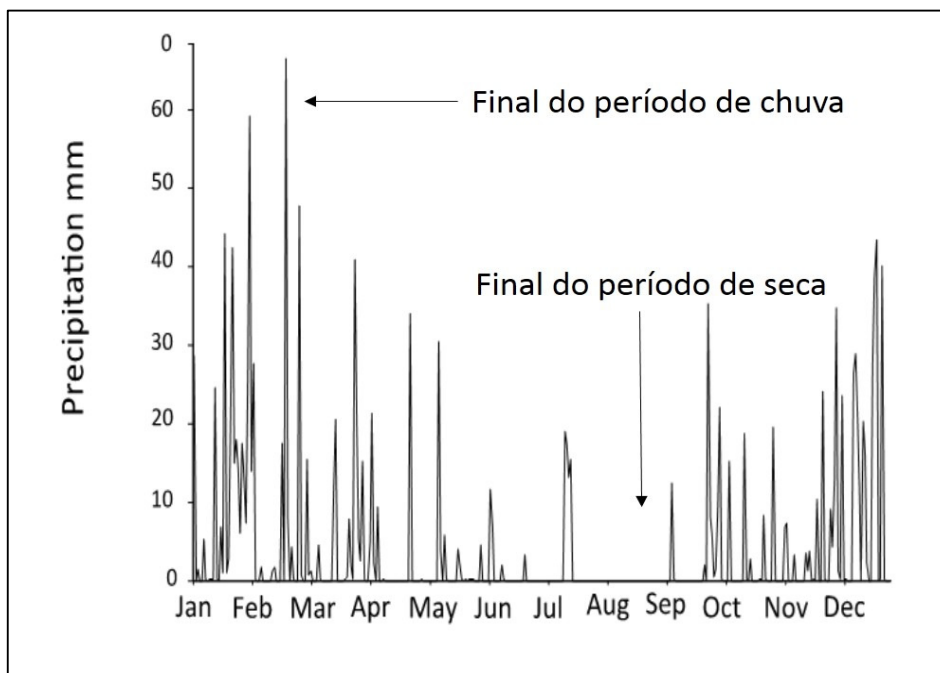


Figura 6 – Gráfico de precipitação ao longo do ano de 2010.

Tabela 1 – Variação de parâmetros ecofisiológicos em época de seca e época de chuva.

Parâmetros Ecofisiológicos	ÚMIDA	SECA
Ψ_w Solo (MPa)	- 0,05±0,05	-2,60 ±0,52
Ψ_w Folhas (MPa)	-2,94±0,35	-2,76±0,15
Condutância estomática (mmol/m²s)	308,37±26,37	207,34±19,73
RWC (%)	77,94±2,71	47,40±4,90

Folhas com limbos cortados em forma de retângulo foram pesadas imediatamente após a coleta, para obtenção do peso fresco (PF). Em seguida as amostras foram colocadas em placas de Petri Ø 9cm, com papel de filtro, imersos em água deionizada e acondicionados por 24 horas a 5°C para reidratação de acordo com Elsheery e Cao (2008). Após esse período as amostras foram novamente pesadas obtendo o peso turgido (PT) e levadas a estufa à temperatura \approx 85 °C até peso constante, para obtenção de peso seco (PS) das amostras. A determinação do RWC foi realizada de acordo com Smart e Bingham (1974), utilizando-se a formula $RWC (\%) = (PF - PS) / (PT - PS) \times 100$. O potencial água (Ψ_w) do solo e da folha foram analisados através do Analisador de Potencial Água com Controlador de Temperatura (WP4-T), obtendo os respectivos valores em mega pascal (MPa). As medições da condutância estomática foram efetuadas utilizando um porômetro em estado de equilíbrio dinâmico (Leaf Porometer Modelo SC-1; DECAGON DEVICES). As medições foram realizadas nas faces adaxial e abaxial das folhas das três espécies, localizadas na parte superior das plantas, expostas à radiação solar relacionando a difusão de CO₂.

2.2. Preparo dos extratos

Os extratos foram preparados no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP de Bauru. Para obtenção do extrato metanólico, 2000g de folhas secas foram submetidos a extração com 5L de metanol à temperatura ambiente, por percolação durante 5 dias. O solvente foi evaporado sob pressão

reduzida em evaporador rotativo e posteriormente liofilizado, obtendo-se 43g de extrato de época úmida (EEU) e 41g de extrato de épocas seca (EES).

2.3. Análise do perfil cromatográfico

Para as análises do perfil cromatográfico do extrato metanólico de copaíba (épocas seca e úmida), foram realizadas análises em cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na análise por cromatografia em camada delgada comparativa foram preparadas amostras de 2mg/mL do extrato e frações e diluídas em metanol, a partir das quais foram aplicadas 20µl em placas de sílica gel em alumínio. A fase móvel utilizada foi 5:6:1:4 (Clorofórmio:Metanol:n-propanol:Água) e as placas foram reveladas por nebulização com anisaldeído seguido de aquecimento a 100°C em sistema fechado. Após a definição das zonas cromatográficas, foram calculados seus respectivos fatores de referência (Rf). O cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado foi o modelo PU-2089S Plus (JASCO®), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos, modelo MD-2015 Plus (JASCO®), injetor automático modelo AS-2055 (JASCO®) e forno de coluna modelo CO-2060 Plus. Foi usada coluna modelo Luna 5u C18 100A (PHENOMENEX®) de 250 x 4,6 mm d.i. e uma coluna de guarda (PHENOMENEX®) de 4 x 3 mm. A fase móvel utilizada foi isocrática MeOH 20% + 0,1% de ac. fórmico em 40 minutos e o cromatograma foi obtido em 254 nm. As análises qualitativas dos extratos foram realizadas com base nos perfis cromatográficos obtidos por CCDC e CLAE/UV-FDA. Os perfis cromatográficos dos dois extratos foram comparados. A intensidade de absorção dos picos também foi observada a fim de identificar compostos pertencentes aos grupos dos flavonoides ou ácidos fenólicos.

2.4. Ensaio biológicos

Para os ensaios biológicos as sementes de sorgo utilizadas foram colocadas em solução 2% de hipoclorito de sódio, por dois minutos, e posteriormente lavadas com água destilada. As sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri Ø 9cm, com 10ml de solução de cada diluição dos extratos estudados e um controle utilizando água deionizada. As sementes foram mantidas na câmara de crescimento em um período de 12 horas de luz e 12 horas de escuro a 25°C.

Para os testes de germinação e crescimento inicial de raiz, foram preparadas soluções estoques com extrato metanólico de *C. langsdorffii* (de épocas úmida e seca); diluídos nas concentrações de 100, 200, 400, 800, 1600 e 3200 mg.L⁻¹ e posteriormente aplicados em placas de Petri Ø 9cm. Os resultados obtidos com o teste de crescimento foram utilizados para

definir concentração a ser aplicada no ensaio biológico para coleta de material análise da expressão gênica.

Para a extração de RNA e quantificação da expressão gênica do miR166 e dos genes SHR e fatores de transcrição HD-ZIP III, o extrato metanólico de *C. langsdorffii* (épocas úmida e seca); foi diluído na concentração de 400 mg.L⁻¹, por apresentar índices de inibição do crescimento de raiz estatisticamente significativos. Também possibilitou a coleta de quantidade de massa dos tecidos radiculares suficientes para isolamento de RNA. Para verificar o possível efeito alelopático do extrato e das frações foram utilizadas sementes de *Sorghum bicolor*, por apresentarem sensibilidade aos efeitos alelopáticos e por apresentar acessos com alta porcentagem de similaridade dos genes sequenciados em *Arabidopsis*. Sementes de sorgo foram cultivadas em placas de Petri como descrito acima.

Depois de 5 dias na câmara de crescimento, foi analisado o número de sementes germinadas a cada 24 horas e ao término do experimento foi analisado o crescimento radicular. Para análise da expressão gênica, as sementes permaneceram por 5 dias na câmara de crescimento, foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C antes da análise. Cada tratamento foi repetido três vezes utilizando 25 sementes em cada um dos experimentos independentes.

2.5. Identificação *in silico* de genes de interesse em sorgo

Para o início do trabalho, se faz necessário a obtenção das sequências dos genes de interesse em sorgo. Primeiramente, sequências dos genes SHR e membros da classe III de fatores de transcrição do tipo HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER (HD-ZIP III) REVOLUTA (REV), PHABULOSA (PHB) e PHAVOLUTA (PHV), foram obtidas da espécie *Arabidopsis thaliana* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Estas serviram como *drivers* para a busca via TBLASTn, realizada dentro do banco de dados público da espécie *Sorghum bicolor* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para os genes SHR e os fatores de transcrição HD ZIP III, foi realizada filogenia com intuito de verificar possíveis ortologias com os genes já descritos de *Arabidopsis thaliana*. Para tanto, foi realizado o alinhamento pelo programa ClustalW (Thompson et al., 1994) com os parâmetros padrões, utilizando as sequências de nucleotídeos traduzidas em aminoácidos. A árvore filogenética final foi gerada utilizando o programa MEGA 5.05, com o modelo de comparação *Neighbor-joining* (Saitou-Nei, 1987), método de distância *p* e supressão *pair-wise*. A robustez dos ramos gerados na árvore pôde ser medida pelo teste probalístico de bootstrap (Sitnikova et al., 1995), originado a partir de 1000 replicatas. As sequências dos genes de sorgo obtidas (Tabela 2) foram utilizadas como molde

para desenhar iniciadores específicos, os quais foram empregados nas análises de expressão gênica via RT- qPCR . Para os genes SHR e fatores de transcrição HD ZIP III, foi construído dendograma de similaridade a fim de propor possíveis ortologias entre os genes de sorgo e de *Arabidopsis* (Figura 3). Segundo Carlsbecker et al., (2010) o gene SHORT ROOT produzido no cilindro vascular, se move para a endoderme onde ativa SCARECROW e juntos esses fatores de transcrição ativam MIR165a e MIR166b. Produzido na endoderme o microRNA165/6 atua degradando os alvos mRNAs codificadores dos fatores de transcrição da III homeodomain-leucine zipper na endoderme, resultando numa distribuição diferencial dos mRNA alvos no cilindro vascular, o que determina os tipos de células do xilema de uma maneira dose-dependente (Figura 7).

Tabela 2 - Genes relacionados a formação do meristema apical e lateral, já descritos na literatura, os quais tiveram sua expressão analisada via RT-qPCR. A tabela mostra os acessos referentes ao sorgo e o melhor resultado do BLASTp.

Gene	Acesso em <i>Sorghum bicolor</i>	E-value	Identidade	Espécie	Referências
SHR	gi 242040520	1E-142	235/435 (54%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Paterson <i>et al.</i> 2009
PHV	gi 242033570	0.0	625/851 (73%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Paterson <i>et al.</i> 2009
PHB	gi 242086245	0.0	599/841 (71%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Paterson <i>et al.</i> 2009
REV	gi 242042548	0.0	586/826 (71%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Paterson <i>et al.</i> 2009

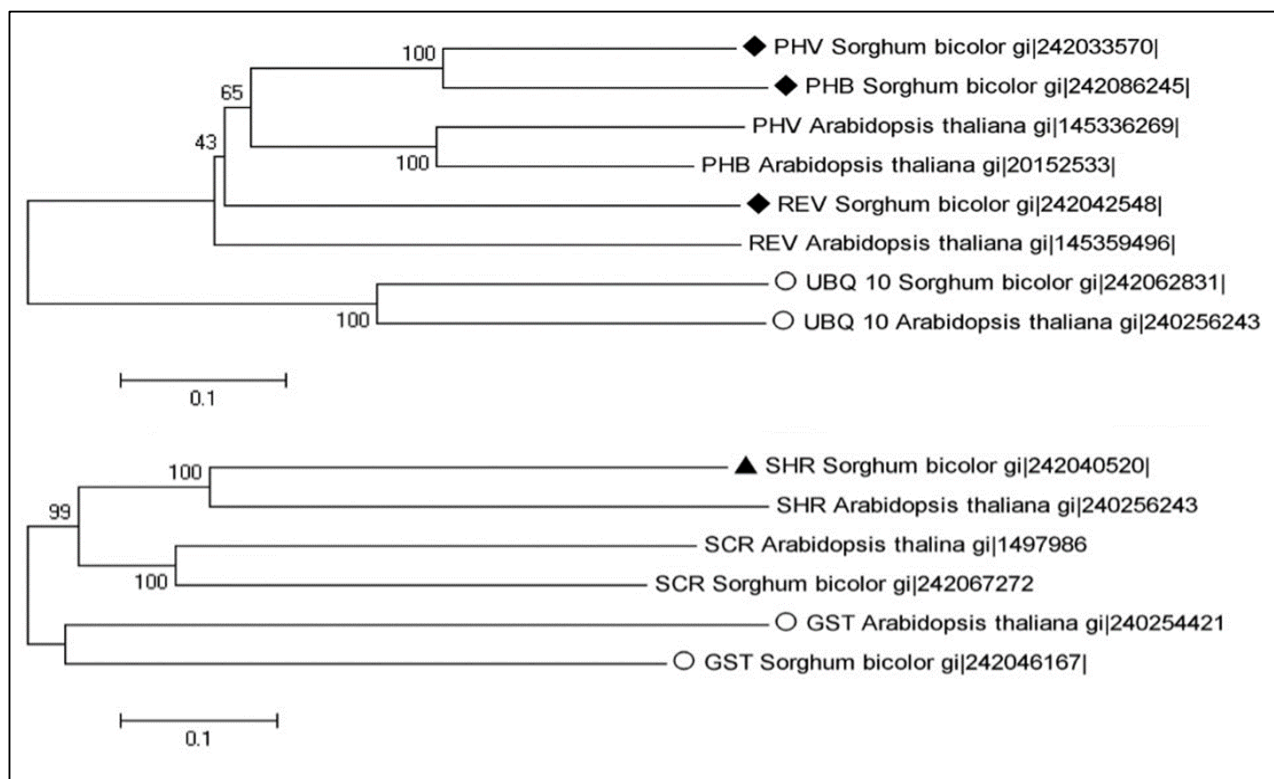


Figura 7 – Dendograma de similaridade comparando as sequências identificadas em *Sorghum bicolor* com *Arabidopsis thaliana*. O dendograma final foi gerado utilizando o programa MEGA 5.05, com o modelo de comparação *Neighbor-joining*, método de distância *p* e supressão *pair-wise*. A robustez dos ramos gerados na árvore pôde ser medida pelo teste probabilístico de *bootstrap*, originado a partir de 1000 replicatas.

2.6. Isolamento e quantificação do RNA total

O isolamento de RNA total de todas as amostras foi feito seguindo-se as recomendações do kit SV Total RNA Isolation System (PROMEGA). Foram utilizadas raízes de 3 repetições com 25 plântulas de cada tratamento e controle, para maceração com auxílio de nitrogênio líquido.

Após a extração do RNA total, as amostras foram tratadas com 2 µl de *DNase I Amplification Grade* (INVITROGEN), seguindo as recomendações do fabricante para a remoção total do DNA genômico das amostras. Em seguida a integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com 0.001% (v/v) de brometo de etídio, em tampão de corrida TAE 1x (40mM Tris-acetato; 1mM EDTA) com tensão constante de 130V. A concentração e pureza do RNA foi avaliada por espectrofotometria de absorção. Finalmente, a ausência de DNA genômico nas amostras de RNA total foi confirmada por meio da realização de PCR usando iniciadores específicos para um gene endógeno (RNA ribossomal 18S).

2.7. Síntese de cDNA via *pulsed stem-loop* RT-PCR

RNA total, tratado com enzima *DNase I*, foi utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA por Pulsed RT-PCR. Essa metodologia é utilizada com eficiência quando acoplada ao PCR quantitativo para avaliar o acúmulo de microRNAs. Juntamente com o iniciador específico para o miRNA 166 (iniciador RT), também foi adicionado oligodT para posterior normalização da quantidade de cDNA utilizado em cada reação de PCR. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 2 µg do RNA total purificado, usando o Kit Improm-II Reverse Transcriptase (PROMEGA). Ao RNA foi adicionado 1µl de dNTP 10mM, 1µl de oligodT (500ng/µl), juntamente com o iniciador RT para o miRNA166 maduro. As amostras foram incubadas a 70°C por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 5µl de Improm-II 5x *Reaction Buffer*, 2,4 µl de MgCl₂ 25mM, 0,6 µl de inibidor de RNase *Ribolock* (FERMENTAS) e 1µl da enzima Improm-II *Reverse Transcriptase*. As reações foram incubadas em termociclador a 16°C por 30 minutos, seguidas por transcrição reversa de 60 ciclos de 30°C por 30 segundos, 42°C por 30 segundos e 50°C por 1 segundo. Para inativação da enzima Improm-II *Reverse Transcriptase*, a reação foi incubada a 70°C durante 15 minutos. Posteriormente, as reações foram armazenadas a -20°C.

2.8. Avaliação da expressão gênica por qPCR

Foram desenhados iniciadores específicos (Tabela 3) baseados nas sequências identificadas, levando em consideração características como T_m (temperatura de *melting*), a formação de dímeros (cross-dimers e self-dimers) e a formação de estruturas secundárias (*hairpins*), analisadas no software *PCR Primer Stats*.

Tabela 3 - Iniciadores específicos utilizados na avaliação da expressão gênica via qPCR

Iniciador	Gene	Sequência	Acesso
SHR F SHR R	Short Root	TGCCCAACAACCTTTAGTCC CACAATCGAACCTCCACCTT	gi 24204052 0
PHB F PHB R	Phabulosa	TTCACTCCACTCCCCACTC ACCGCCTAGTAGTGCAGCAG	gi 24208624 5
PHV F PHV R	Phavoluta	CACTCGGACTCGATCATGTG TCAAGGGAGATGTCCTGGAG	gi 24203357 0
REV F REV R	Revoluta	AGGCATTATTTGTGCGAAGG GAAGCCAATACGCATCCAT	gi 24204254 8
miR166 F miR166 RT Reverso universal	 miR166	CCTGAGTCGGACCAGGCTCA GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG GTATTCGCACTGGATACGACGGGGAA GTGCAGGGTCCGAGG	MIMAT001 2185
18S F 18S R	rRNA 18S	GGCTCGAAGACGATCAGATACC TCGGCATCGTTTATGGTT	Cook <i>et al.</i> , 2010

As reações de amplificação qPCR foram realizadas em volume final de 20 µl, utilizando 4 µl de cDNA na diluição de 1:10 (v:v), 0,4 de cada iniciador na concentração de 10mM, 10 µl de GoTaq qPCR Master Mix (PROMEGA), 0,18 µl de reference e 5,02 água milli-Q. A amplificação ocorreu em termociclicador 7300 Real-Time PCR System (APPLIED BIOSYSTEMS). O programa utilizado foi: 95°C por 2 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Após a termociclagem, curvas de dissociação foram determinadas para cada ponto amplificado (curva de *melting*). Todas as reações foram feitas em duplicatas técnicas, incluindo uma amostra controle (NTC) contendo somente água *milli-Q*.

O método escolhido para análise da expressão gênica foi a quantificação relativa, pois a transcrição do gene não foi expressa em número absoluto de transcritos da amostra, e sim em relação a quantidade relativa de transcritos de outro gene cuja expressão é adotada

como constante denominado gene normalizador. O gene codificante para o rRNA 18S foi escolhido como gene normalizador (Cook et al., 2010). O cálculo da expressão relativa foi realizado pelo método descrito por Pfaffl e Hageleit (2001), onde a razão de expressão relativa dos genes alvo foi calculada com base na sua eficiência e na diferença de Ct ($\Delta Ct - threshold\ cycle$) de uma amostra desconhecida (tratamento) versus um controle (controle - tratamento), mostrado na equação da figura 2. A eficiência foi calculada utilizando o *slope* dado pela curva padrão de diluições 1; 0.1; 0.01 e 0.001; de cada gene na PCR em tempo real, através da seguinte fórmula: $E = -1 + 10^{(-1/slope)}$.

$$\text{Razão} = \frac{(E \text{ gene alvo}) \Delta Ct \text{ alvo}}{(E \text{ gene endógeno}) \Delta Ct \text{ endógeno}}$$

Onde: E= eficiência; ΔCt = diferença de Ct do controle – tratado.

3. Resultados e discussão

3.1. Análise do perfil cromatográfico e sazonalidade

Os resultados obtidos com o cromatograma comparativo, por CLAE - UV FDA e CCDC, figura 8A e 8B respectivamente, entre os extratos de épocas seca e úmida, indicam grande semelhança entre os dois extratos qualitativamente. Podemos observar ainda de acordo com a figura 8B a presença de compostos fenólicos como flavonoides, bem caracterizados pelas bandas amarelas no centro da figura 8B, e também por taninos que se encontram caracterizados pela banda mais escura na parte superior da imagem. Ainda, de acordo com o cromatograma obtido por CLAE (Figura 8A), o pico no tempo de retenção 12 minutos um ácido fenólico (Figura 8C) e o pico de maior absorbância (tempo de retenção 18 min) (Figura 8D), representa um flavonoide, observados no espectro UV/FDA.

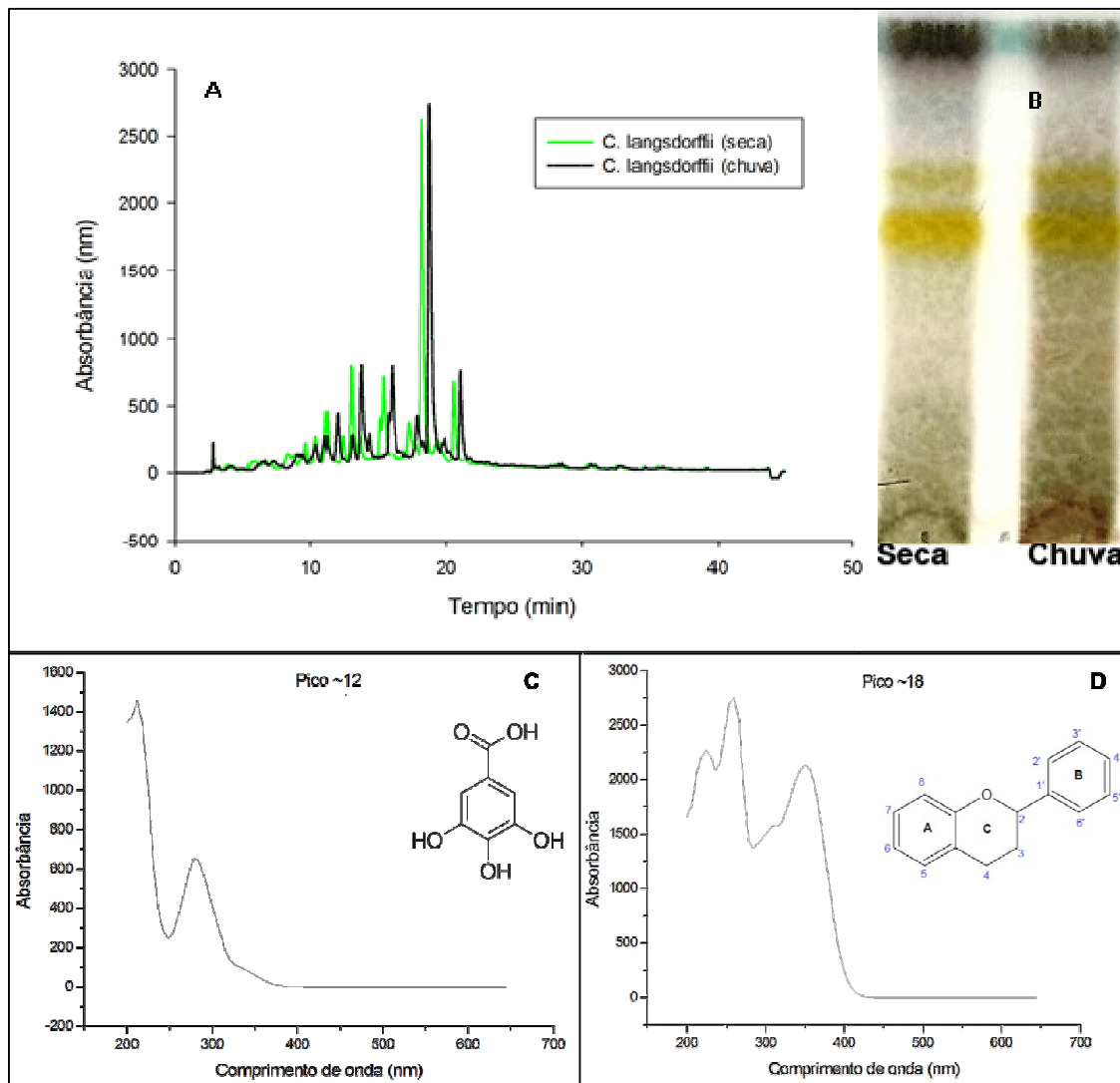


Figura 8 – Cromatograma (A-CLAE; B-CCDC) comparativo entre extratos metanólicos de folhas de *C. langsdorffii* coletadas em diferentes sazonalidades. Espectro UV/PDA e exemplo estrutural das moléculas, em (C) um ácido fenólico (tempo de retenção 12 min.), em (D) o maior pico do cromatograma (tempo de retenção 18 min.) indicando a presença de um flavonoide.

Dados ecofisiológicos e ambientais (Figura 1 e Tabela 1) comprovam o efeito da sazonalidade do Cerrado sobre copaíba. Maiores valores de condutância estomática e RWC comprovam que a disponibilidade hídrica ao final da época úmida foi capaz de aumentar as trocas gasosas e manter os tecidos vegetais bem hidratados. Os dados referentes ao potencial hídrico do solo (Ψ_w) indicam a baixa capacidade de movimento de água entre as partículas do solo decorrente do período de estiagem ao final da época seca. A variação da disponibilidade hídrica é um fator que frequentemente apresenta consequências importantes nas

concentrações de metabólitos secundários em plantas (Gerhezon, 1984; Waterman e Mole, 1989) e estes são oriundos de carbonos da fotossíntese (Delfine et al., 2005). A inibição da fotossíntese pelo estresse hídrico é um fator transitório que implica limitações na assimilação de CO₂ devido ao fechamento estomático (Delfine et al. 2005). No entanto maior disponibilidade hídrica pode induzir a abertura estomática por mais tempo em épocas úmidas favorecendo as trocas gasosas (Souza et al., 2004). Delfine et al. (2005) observaram que plantas de hortelã sob estresse hídrico sofriam redução nos níveis fotossintéticos devido a baixa disponibilidade de carbono causada pela baixa condutância dos estômatos e redução da biomassa fato que levou a diminuição da síntese de monoterpenos. Exemplos da influência da disponibilidade hídrica na produção de metabólitos secundários são citados por Palá-Paúl et al. (2001) que demonstram maior produção de alguns dos componentes do óleo essencial de *Santolina rosmarinus*. Por outro lado, Ndamba et al. (2004) observaram menor produção de saponinas, como a lemmatoxina em *Phytolacca dodecandra*. Em *Hypericum perforatum* há um aumento significativo na concentração de flavonóides, hipericinas e ácido clorogênico nas flores sob condições de estresse hídrico, porém, há um decréscimo na concentração de hiperforinas (Gray et al., 2003). Em *Lippia alba* variações qualitativas e quantitativas em relação ao período de colheita foram realizados e os resultados apresentaram correlação com dados ambientais. O rendimento do óleo essencial variou entre 0,33 e 0,67%. A diversidade dos constituintes químicos aumentou ao longo do ano, sendo 1,8-cineol e linalol os componentes principais (Barros et al., 2009).

Apesar de a sazonalidade estar associada com a alteração do perfil químico, a metodologia empregada, não permitiu observar diferença qualitativa e nem quantificar os compostos presentes. Porém, Sousa et al. (2012) observaram em folhas de *C. langsdorffii* a presença de cinco derivados flavonóis, rutina, 3-O- α -ramnopiranosil-quercetina, 3-O- α -ramnopiranosil-canferol, quercetina e kampferol, e análises sazonais revelaram a presença teores médios de 3-O- α -ramnopiranosil-quercetina e 3-O- α -ramnopiranosil-canferol variando de 1 a 1.8% no período de fevereiro de 2009 a março de 2010. Portanto, nossos dados fitoquímicos não indicam grandes alterações no perfil por CLAE, mas pode estar havendo pequenas mudanças nas concentrações dos constituintes químicos as quais só serão diagnosticadas com a identificação e quantificação das substâncias majoritárias dos extratos.

3.2. Ensaio Biológicos

Foram avaliados o índice de velocidade germinação (IVG) e crescimento de raiz de sorgo sob efeito dos extratos metanólicos de copaíba em diferentes épocas de disponibilidade

hídrica (seca e úmida). Como podemos observar na figura 9A, o IVG foi significativamente afetado por doses do extrato de época úmida (EEU) e extrato época seca (EES). Avaliando separadamente cada tratamento, podemos observar que o EEU atrasou a emissão da radícula e apresenta diferença estatística em quase todas as doses testadas, exceto na dose de 200 mg.L⁻¹. Já o EES apresenta inibição estatisticamente significativa apenas em duas doses testadas, 800 e 1600 mg.L⁻¹. Ambos extratos mostraram capacidade de diminuir a velocidade de germinação, porém não interferiram significativamente na porcentagem final de sementes germinadas (Tabela 4). Quanto ao crescimento radicular, podemos observar na figura 9B e 9E, que todas as doses testadas apresentaram efeito inibitório estatisticamente significativo, ressaltando grande poder inibitório dos extratos. Comparando EEU e EES, podemos observar maiores efeitos inibitórios no EEU, o qual afeta drasticamente, desde a velocidade de germinação, provocando atraso na emissão da radícula, observado pelo IVG, até o desenvolvimento inicial de raiz, onde o crescimento, em relação ao controle, é menor do que o apresentado pelo EES. Silva et al. (2012) realizaram experimentos de pré e pós emergência de sementes de *Lactuca sativa* em solos coletados abaixo de copas de *Copaifera langsdorffii*, em diferentes épocas (seca e úmida), observando que a germinação não foi alterada, porém o sincronismo de germinação foi alterado significativamente independente da época da coleta. Os mesmos autores também observaram que o crescimento inicial de raiz foi significativamente alterado. Souza Filho et al. (2010) estudaram o potencial alelopático de três espécies de *Copaifera*, *C. duckei*, *C. martii* e *C. reticulata*, sobre a germinação e o crescimento de raiz de plantas daninhas e observaram que o extrato etanólico de folhas e galhos de *C. martii* e *C. reticulata* apresentaram alto potencial para inibir a germinação de sementes, já *C. duckei* não apresentou efeito inibitório na germinação de sementes, porém cascas, galhos e principalmente folhas de *C. duckei* apresentaram potencial inibitório mais expressivo sobre o desenvolvimento da raiz.

A diminuição da velocidade de germinação observada no IVG é um indicador da ação dos compostos aleloquímicos que afetam os mecanismos de alongamento e divisão celular, porém observa-se que mesmo com essa queda no IVG, a germinação final não difere do controle (Tabela 4). Hoagland e Williams (2004) observaram que isso pode ocorrer através da ativação de mecanismos de detoxificação celular que impede o efeito das substâncias inibitórias através de enzimas do metabolismo oxidativo.

Tabela 4 – Efeito do extrato de copaíba de época úmida (EEU) e seca (EES) na germinação de sementes de sorgo. ns: A média geral do tratamento não difere significativamente da média geral do controle; $p > 0,05$.

Concentração	Germinação (%)	
	EEU	EES
Controle	90.00±1.22	90.00±1.22
100 mg.L ⁻¹	90.00ns±0.71	93.33ns±0.82
200 mg.L ⁻¹	80.00ns±0.71	86.67ns±1.08
400 mg.L ⁻¹	83.33ns±0.82	90.00ns±0.71
800 mg.L ⁻¹	90.00ns±0.71	80.00ns±1.41
1600 mg.L ⁻¹	93.33ns±0.82	83.33ns±0.41
3200 mg.L ⁻¹	83.33ns±1.47	86.67ns±0.41

O crescimento de raiz pode se mostrar mais sensível ao efeito dos aleloquímicos quando comparado com processo de germinação, uma vez que a inibição do desenvolvimento do sistema radicular leva a redução na pressão competitiva da planta favorecendo as espécies vizinhas (Ferreira e Aquila, 2000; Prates et al, 2000). Outros trabalhos relatam maior sensibilidade aos aleloquímicos no desenvolvimento de raiz do que na germinação. Extratos aquosos de folhas de *Sorghum bicolor*, *Helianthus annuus*, *Brassica campestris*, *Morris alba*, *Eucalyptus camaldulensis* e *Withania somnifera* foram aplicados sobre as seguintes espécies de plantas daninhas do arroz: *Trianthema portulacastrum*, *Echinochloa colona*, *E. crus-galli*, *Cyperus rotundus* e *C. iria*, onde foi observado efeitos significativos na redução do comprimento das raízes (Khaliq et al., 2013). Almeida et al. (2008) verificaram ao extrato metanólico de folhas de *Leonurus sibiricus* afetaram a germinação e o crescimento de raiz de *Cucumis sativus*, porém o crescimento de raiz se mostrou mais sensível comparado ao efeito na germinação. De Martino et al. (2012) testou o efeito de diversos flavonoides na germinação e no crescimento inicial de raiz de *Raphanus sativus* L. e *Lepidium sativum* L.,

observando que a germinação foi ligeiramente afetada enquanto o crescimento inicial de raiz foi afetado significativamente.

A presença de flavonoides observada pela análise do perfil fitoquímico, pode ter influência nos efeitos biológicos observados, pois no meio intracelular, flavonoides assumem carga negativa em pH neutro, e em baixas concentrações podem promover o crescimento celular aumentando a eficiência de enzimas, proteínas e carreadores de elétrons; porém em altas concentrações, podem hiperpolarizar membranas, alterando o funcionamento de bombas de ATP, caracterizando flavonoides como tóxicos para as células, causando a redução no crescimento (De Martino et al. 2012). O pH citoplasmático é mantido a um valor próximo de neutralidade por mecanismos de troca iônica no plasmalema e pela elevada capacidade de tamponamento do citosol (Roos e Boron, 1981; Kurkdjian e Guern, 1989; Hedrich, 2012). Outro efeito da hiperpolarização é a abertura de canais dependentes de hiperpolarização. Este tipo de canal é classificado como um canal não seletivo de cátions, permeável ao K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Ba^{2+} (Very e Davies, 2000, Hedrich, 2012), podendo causar o desbalanceamento na quantidade destes elementos. Bais et al. (2003) mostraram em *Arabidopsis thaliana* que a fitotoxina (-)-catequina, desencadeia produção de espécies reativas de oxigênio, iniciado no meristema radicular, o que leva a cascata de sinalização por Ca^{2+} . A concentração de Ca^{2+} no citosol é baixa quando comparada com vacúolo e outras organelas, pois ATPases transportadoras de cálcio localizadas no plasmalema retiram cálcio do citosol. Porém o aumento na concentração de cálcio no citosol ativa a calmodulina a qual é responsável por ativar diferentes enzimas (Malavolta et al., 1997; Alberts et al., 1997).

O Ca^{2+} é um importante mensageiro secundário, e tem papel no início da sinalização de inúmeros processos, como estabilidade de membranas e células, integridade celular, ativação de várias enzimas (Ohori-Ihara et al., 2007; Resende et al., 2007). Também modula a atividade de proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK) que possuem papel importante na sinalização durante situações de estresse (Popescu et al., 2007) e funciona também como co-fator para a enzima β -1,3-glucana sintase (calose sintase), enzima chave de defesa das plantas (Hammond-Kosack e Jones, 2000) e desencadeia alterações na expressão de genes relacionados com diferentes funções fisiológicas (Bais et al., 2003).

Como o desenvolvimento radicular foi mais afetado, foram analisadas a expressão dos genes relacionados ao desenvolvimento de raiz, descritos na Tabela 3, sob efeito de cada um dos extratos utilizados nos ensaios biológicos.

Na figura 9C podemos observar a expressão relativa dos genes SHR, miRNA 166, PHV, PHB e REV sob efeito do extrato de copaíba de época úmida (EEU). Constatou-se um

aumento na expressão de SHR de 8.8 vezes em relação ao controle; a expressão do miRNA 166 aumentou em 4.9 vezes em relação ao controle; e a expressão dos fatores de transcrição HD ZIP III; PHV, PHB e REV; aumentou 1.2, 1.7 e 1.4 vezes respectivamente.

Na figura 9D podemos observar a expressão relativa dos genes SHR, miRNA 166, PHV, PHB e REV sob efeito do extrato de copaíba de época seca (EES). Constatou-se um aumento na expressão de SHR de 2 vezes em relação ao controle, a expressão do miRNA 166 aumentou 1.4 vezes em relação ao controle, e a expressão dos fatores de transcrição HD ZIP III; PHV, PHB e REV; aumentou 3.3, 12.1 e 1.4 vezes respectivamente.

Comparativamente, a indução de SHR foi aproximadamente quatro vezes maior em raízes tratadas com EEU em relação àquelas submetidas ao EES. Proporção semelhante foi encontrada nos níveis de transcritos de miRNA 166 que apresentou indução três vezes maior nos tratamentos com EEU em relação àquelas submetidas ao EES. Essa proporção era esperada, pois transcritos de SHR induzem a expressão de SCR e juntos, SHR e SCR induzem a expressão de miR166 na endoderme (Levesque et al., 2006; Carlsbecker et al., 2010).

EEU aumenta os níveis de transcritos de SHR e miRNA 166 de tal forma que pode ter levado a desregulação da via de identidade celular da endoderme e do centro quiescente da raiz (Benfey et al., 1993; Scheres et al., 1995; Yu et al., 2010). Por outro lado, Helariutta et al. (2000) e Petricka et al. (2012) indicam que a expressão SHR tem papel importante na sinalização molecular radial da raiz que, através de expressão ectópica, leva ao aumento da divisão celular e especificação anormal de células do meristema. Portanto, o aumento de SHR encontrado pode ter sido em função da expressão fora de locais onde normalmente ocorreria. Ainda, a mistura de substâncias químicas presentes no extrato (composto majoritariamente por flavonoides) podem ter levado a alteração da integridade das membranas em função de ter alterado os padrões de polarização e funcionamento de transportadores (De Martino et al., 2012; Hedrich, 2012). Isso explica as características fenotípicas encontradas nas plântulas tratadas com EEU com raízes extremamente curtas e deformadas. Assim, sinalização para divisão celular, identidade celular e padronização das células do meristema não depende apenas de alterações no padrão radial de expressão de SHR (Helariutta et al., 2000; Petricka et al., 2012) e sim da ação complementar de outros reguladores como enzimas, mensageiros secundários e integridade da membrana celular (Hedrich, 2012). Portanto, tanto a sinalização para divisão celular, quanto para a identidade celular das células endoderme não necessariamente são revertidas em formação de tecido meristemático, pois a integridade das células pode ter sido comprometida por outros fatores fisiológicos.

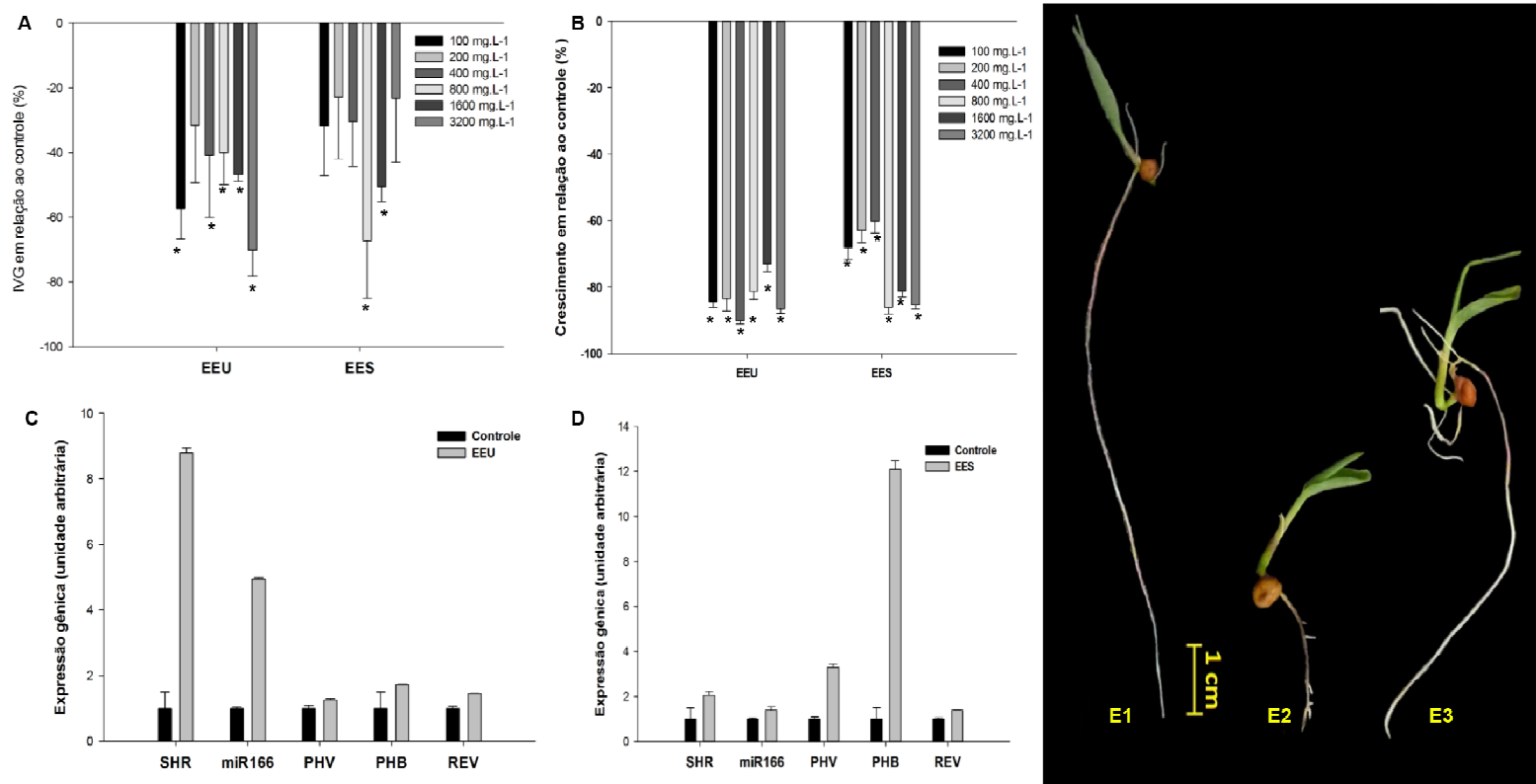


Figura 9 – Índice de velocidade de germinação de plântulas de sorgo sob efeito de diferentes tratamentos (A) porcentagem de crescimento de raízes de sorgo em relação ao controle, sob efeito de diferentes doses e tratamentos (B) *Nível de significância $p < 0,05$ por análise de variância seguido por teste de Tukey. Expressão relativa dos genes SHR, miRNA 166, PHV, PHB e REV em raiz de sorgo tratadas com EEU (C) e EES (D). A expressão dos genes é representada no eixo Y com a razão (expressão relativa) do valor absoluto da expressão de cada gene pelo valor da expressão do gene normalizador RNA ribossomal 18S. No eixo X estão representados cada gene avaliado e as barras verticais representam o desvio padrão de três amostras biológicas. Plântulas de sorgo tratadas com diferentes extratos de copaíba (E), onde E1-Controle; E2-EEU; E3-EES. EEU = extrato de época úmida; EES = extrato de época seca.

Ainda, era esperado que com a indução da expressão de miR166, a expressão dos fatores de transcrição da família HD-ZIP III seria menor em relação ao controle, devido a regulação pós transcricional por miR166 (Juarez et al., 2004). Essa restrição de transcritos ocorre de maneira dose dependente (Carlsbecker et al., 2010), portanto em locais onde miR166 está presente, ocorre inibição de transcritos da família HD-ZIP III (Zhu et al., 2011). Essa relação não foi inteiramente observada nos experimentos, pois em todos os tratamentos a expressão do FT HD ZIP III foi próxima ao controle, mesmo ocorrendo a expressão do miRNA 166. No entanto, a quantidade de transcritos de PHB nas raízes tratadas com EES foi aumentada (indução seis vezes maior) quando comparados aos tratamentos de EEU.

EES aumenta os níveis de transcritos de PHB de forma mais expressiva. Os níveis próximo ao controle de SHR e miRNA 166 podem ter permitido o aumento da expressão do PHB. Ou ainda, o PHB pode ter sido afetado de forma independente pelos compostos químicos presentes no extrato. Segundo Carlsbecker et al. (2010) a expressão de PHB determina o tipo de xilema: altos níveis levam a formação de metaxilema (xilema ativo), e baixos níveis, a formação de protoxilema. O gene PHB é o único membro da família HD-ZIP III que possui domínios de transcrição fora do cilindro vascular, ocorrendo também na endoderme, e possui atividade na ontogênese radicular como fator de transcrição no periciclo. O aumento da expressão PHB é observado assim que ocorrem as primeiras alterações morfológicas no periciclo após o início das divisões celulares, permanecendo elevada até a emergência da raiz lateral (Hawker e Bowman, 2004). O fato é que o aumento de PHB sinaliza para a retomada da atividade meristemática do periciclo. Os dados encontrados corroboram com a literatura e podem indicar que EES afeta a identidade do periciclo via PHB, pois quanto maior a atividade nestas células maior será a capacidade de produção de raízes laterais.

De qualquer forma, o movimento radial de água do ambiente para o interior da raiz ocorre na região de diferenciação que possui metaxilema funcional e pêlos radiculares responsáveis pela absorção. A entrada do extrato pelas raízes pressupõe a passagem pelas células corticais, seguindo para a endoderme e chegando ao periciclo e xilema (Taiz e Zeiger, 2010). Portanto, o efeito dos constituintes químicos presentes nos extratos deve ocorrer primeiramente nas células da endoderme levando a alterações bioquímicas e moleculares. As moléculas tendem a ser inativadas após entrarem em contato com a maquinaria bioquímica celular endodérmica, portanto a quantidade de compostos ativos que chegam às regiões do periciclo e xilema será menor, diminuindo o efeito fitotóxico nesta região.

Assim, podemos concluir que os EEU e EES apresentam atividade alelopática responsáveis pela redução do crescimento de raiz em sorgo. Embora os extratos de *C. langsdorffii* tenham perfil químico semelhantes, os alvos moleculares afetados são distintos, sendo o EEU apresentando maior correlação com SHR e miRNA 166 e o EES correlação com o PHB. Esses dados permitem supor a existência sutis alterações nas concentrações de compostos químicos presentes nos extratos de diferentes épocas do ano que deverão ser diagnosticadas por experimentos fitoquímicos de isolamento e quantificação dos compostos majoritários.

4. Referências

ACHARD, P.; HERR, A.; BAULCOMBE, D.C.; HARBERD, N.P. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated MicroRNA. **Development**, v.131, p.3357-3365, 2004.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M. **Biologia molecular da célula**. 3ªed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1268p.

ALMEIDA, L.F.R.; SANOMIYA, M.; RODRIGUES, C.M.; DELACHIAVE, M.E.A.; MANCINE, E.; VILEGAS, W.; DE FEO, V. *In vitro* allelopathic effect of extracts from *Leonurus sibiricus* leaves. **Journal Plant Interactions**, v.3,n.1,p.38-49, 2008.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. 1ª Ed. Embrapa: Planaltina. 1998, 143p.

ALVES, M.C.S.; MEDEIROS, FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S.B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.39, p.1083-1086, 2004.

BAIS, H.P.; VEPACHEDU, R.; GILROY, S.; CALLAWAY, R.M.; VIVANCO, J.M. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules an genes to species interactions. **Science**, v.301, p. 1377–1380, 2003.

BARROS, F.M.C.; ZAMBARDA E.O.; HEINZMANN, B.M.; MALLMANN, C.A. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**. v.4, p.861-867, 2009.

BELZ, R.G. Allelopathy in crop/weed interactions – an update. **Pest Management Science**. v.63, p.308–326, 2007.

BENFEY, P.N.; LINSTEAD, P.J.; ROBERTS, K.; SCHIEFELBEIN, J.W.; HAUSER, M.T.; AESCHBACHER, R.A. Root development in *Arabidopsis*: Four mutants with dramatically altered root morphogenesis. **Development**. v.119, p.57-70, 1993.

BENINGER, C.W.; HALL, J.C. Allelopathic activity of luteolin 7-O- β -glucuronide isolated from *Chrysanthemum morifolium* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.33, p.103–111, 2005.

BESSA, T.; HERNANDE-TERRONES, M.G.; SANTOS, D.Q. Avaliação fitoquímica e identificação de metabólitos secundários de raiz de *Cenchrus echinatus*. **Horizonte Científico** v.1, 2007.

CARLSBECKER, A.; LEE, J.; ROBERTS, C.J.; DETTMER, J.; LEHESRANTA, S.; ZHOU, J.; LINDGREN, O.; MORENO-RISUENO, M.A.; VATE'N, A.; THITAMADEE, S.; CAMPILHO, A., SEBASTIAN, J.; BOWMAN, J.L., HELARIUTTA, Y.; BENFEY, P.N. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. **Nature**, v. 465, p. 316-321, 2010.

CETNARSKI FILHO R.; NOGUEIRA, A.C. Influência da temperatura na germinação de diásporos de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (canela-sassafrás). **Ciência Florestal**, v.5, p.191-198, 2005.

COOK, D.; RIMANDO, A.M.; CLEMENTE, T.E.; SCHRÖDER, J.; DAYAN, F.E.; NANAYAKKARA, N.P.D.; PAN, Z.; NOONAN, BP.; FISHBEIN, M.; ABE, I.; DUKE, S.O.; BAERSON, S.R. Alkylresorcinol Synthases Expressed in *Sorghum bicolor* Root Hairs Play an Essential Role in the Biosynthesis of the Allelopathic Benzoquinone Sorgoleone. **The Plant Cell**, v.22, p.867–887, 2010.

CUTLER, H.G.; CUTLER, S.J. Agrochemicals and Pharmaceuticals: The connection. In: **Biologically active natural products: Agrochemicals**. Boca Raton, Florida, 1999. p.1-14.

DE MARTINO, L.; MENCHERINI, T.; MANCINI, E.; AQUINO, R.P.; ALMEIDA, L.F.R.; DE FEO, V. b In Vitro Phytotoxicity and Antioxidant Activity of Selected Flavonoids. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p.5406-5419, 2012.

DELFINE, S.; LORETO, F.; PINELLI, P.; TOGNETTI, R.; ALVINO, A. Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and spearmint plants under water stress. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v.106, p. 243–252, 2005.

ELSHEERY, N.I., CAO, E.K.F. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30. p. 769-777, 2008.

EMERY, J.F.; FLOYD, S.K.; ALVAREZ, J.; ESHED, Y.; HAWKER, N.P.; IZHAKI, A.; BAUM, S.F.; Bowman JL. Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. **Current Biology**, v.13, p.1768-1774, 2003. Ferreira e Aquila, 2000;

GERSHENZON, J. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. **Recent Advances in Phytochemistry**, v.18, p.273–320, 1984.

GRAY, D.E.; PALLARDY, S.G.; GARRETT, H.E. & ROTTINGHAUS, G.E. Effect of acute drought stress and time of harvest on phytochemistry and dry weight of St. John's wort leaves and flowers. **Planta Medica**, v.69, pp.1024-1030, 2003.

HAMMOND-KOSACK K.E.; JONES J.D.G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville, Maryland: APS Press, 2000. p. 1102-56. Hawker e Bowman (2004)

HEDRICH, R. Ion channels in plants. **Physiological Reviews**, v.92, n.4, p.1777–1811, 2012.

HELARIUTTA, Y.; FUKAKI, H.; WYSOCKA-DILLER, J.; NAKAJIMA, K.; JUNG, J.; SENA, G.; HAUSER, M.T; BENFEY, P.N. The SHORT-ROOT Gene Controls Radial Patterning of the *Arabidopsis* Root through Radial Signaling. **Cell**, v. 101, p. 555-567, 2000.

HOAGLAND, R.E.; WILLIAMS, R.D. **Bioassays-useful tools of the study of allelopathy**. In: MACIAS, F.A. et al. (Eds.) **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, Florida: CRC Press. 2004. p.315-41. Juarez et al. 2004

KHALIQ, A.; MATLOOB, A.; KHAN, M.B.; TANVEER, A. Differential suppression of rice weeds by allelopathic plant aqueous extracts. **Planta daninha**, vol.31, n.1, p.21-28, 2013.

KURKDJIAN, A.; GUERN, J. Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, p.271-303, 1989.

LANGENNHEIM, J.H. **Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology and Ethnobotany**. Cambridge: Timber Press. 2003. 378p.

LEVESQUE MP.; VERNOUX, T.; BUSCH, W.; CUI, H.; WANG, J.Y.; BLILOU, I.; HASSAN, H.; NAKAJIMA, K.; MATSUMOTO, N.; LOHMANN, J.U.; SCHERES, B.; BENFEY, P.N. Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in *Arabidopsis*. **PLoS Biology**, v.4, n.5, e143, p. 739-749, 2006.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa/SP: Plantarum. 2ª Ed. 2002, 349p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Potafos. 1997. 319p.

MALLORY, A.C.; BARTEL, D.P.; BARTEL, B. MicroRNA directed regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. **The Plant Cell**, v.17, n.5, p.1360-1375, 2005.

MATHELA, C.S., GUPTA, UPRETI, P., PANT, A.K., OLMSTEAD, M.M., HOPE, H., BOTTINI, A.T. Coleon U 12-Methyl Ether from *Nepeta, leucophylla*. **Journal of natural products**. v. 54, n.3, p. 910-912.

MOREIRA, P.F.S.D.; SOUZA, D.R.; TERRONES, M.G.H. Avaliação do potencial alelopático do extrato metanólico obtido das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi) na inibição do desenvolvimento da raiz em sementes de *Panicum maximum*. **Bioscience Journal**, v.24, n.3, p.74-79, 2008.

NAKAJIMA, K.; SENA, G.; NAWY, T.; BENFEY, P.N. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. **Nature**, v.413, p.307-311, 2001.

OHORI-IHARA Y.; NAGANO, M.; MUTO, S.; UCHIMIYA H.; KAWAIYAMADA, M. Cell death suppressor *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 is associated with calmodulin binding and iron homeostasis. **Plant Physiology**, v.143, p.650-60, 2007.

OLIVEIRA P.S.; MARQUIS, R.J. The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna. Columbia University Press: New York. 1ªEd. 2002. 289p.

OTSUGA, D.; DEGUZMAN, B.; PRIGGE, M.J.; DREWS, G.N.; CLARK, S.E. REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. **The Plant Journal**, v.25, n.2 p.223-236, 2001.

PACE-ASCIAK, C. R.; HAHN, S. E.; DIAMANDIS, E. P.; SOLEAS, G.; GOLDBERG, D. M. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. **Clinica Chimica Acta**, v.235, p.207-219, 1995.

PALÁ-PAÚL, J.; PÉREZ-ALONSO, M. J.; VELASCO-NEGUERUELA, A.; PALÁ- PAÚL, R.; SANZ, J.; CONEJERO, F. Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *Rosmarinifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, pp.652-663, 2001.

PANNACCI, E.; BARTOLINI, S.; COVARELLI G. Chemical weed control in biomass sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Agricultural Segment**, v.1, n.1, 2010

PARVEZ M.M. et al. Effects of quercetin and its seven derivatives on the growth of *Arabidopsis thaliana* and *Neurospora crassa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.631–635, 2004.

PATTERSON, K.D.; CLEAVER, O.; GERBER, W.V.; WHITE, F.G.; KRIEG, P.A. Distinct expression patterns for two *Xenopus* Bar homeobox genes. **Development Genes and Evolution**, v. 210, p. 140–144, 2000.

PEER, W.A.; MURPHY, A.S. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? **Trends in Plant Science**, v.12, n.12, p.556–563, Dec 2007.

PETRICKA, J.J., SCHAUER, M.A., MEGRAW, M., BREAKFIELD, N.W., THOMPSON, J.W., GEORGIEV, S., SODERBLUM, E.J., OHLER, U., MOSELEY, M.A., GROSSNIKLAUS, U., BENFEY, P.N.. The protein expression landscape of the *Arabidopsis* root. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.109, p. 6811-8, 2012.

PFAFFL, M.W.; HAGELEIT, M. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. **Biotechnology Letters**, v.23, p.275-282, 2001.

POPESCU, S.C.; POPESCU, G.V.; ZHANG, Z.; SEAY, M.S.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M.; DINESHKUMAR, S.P. Differential bindings of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density Arabidopsis proteins microarrays. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, n.11, p.4730-4735, 2007.

PRATES, H.T.; PAES, J.M.V.; PIRES, N.M.; PEREIRA FILHO, I.A.; MAGALHÃES, P.C. Efeito do extrato aquoso de *Leucena* na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p. 909-14, 2000.

RESENDE, L.V.; BARRETTI, P.B.; MEDEIROS, F.C.L.; SILVA, D.D.; PEREIRA, R.B.; LINS, S.R.O.; PEREIRA, L.M.; CAMPOS, M.A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v.15, p.129-198, 2007.

RIBEIRO, J.F., WALTER, B.M.T., 1998. Fitofisionomias do bioma Cerrado. IN: SANO, S.M., ALMEIDA, S.M, (Eds.), **Cerrado: ambiente e flora**. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, pp.89-166.

SCHIEFELBEIN, J.W., MASUCCI, J.D., AND WANT, H. Building a Root: The Control of Patterning and Morphogenesis during Root Development. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1089-1098.

RICE – EVANS, C.A.; PACKER, L. **Flavonoids in health and disease**. New York: Marcel Dekker. 1998. p.447-467.

RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. **Allelopathy: Basic and Applied aspects**. London: Chapman e Hall. 1992. 480p.

ROOS, A.; BORON, W.F. Intracellular pH. **Physiological Reviews**, v.61 n.2, p.269-434, 1981.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, n.4 p.406-425, 1987.

- SANTANA, D. G.; RANAL, M.A.; MUSTAFA, P.C.V; SILVA, R.M.G. Germination measurements to evaluate in allelopathic interactions. **Allelopathic Journal**, v. 17, n. 1, p. 43-52, 2006.
- SCHERES, B.; DI LAURENZIO, L.; WILLEMSSEN, V.; HAUSER, M.T.; JANMAAT, K.; WEISBEEK, P.; BENFEY, P.N. Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. **Development**, v.121, p.53–62, 1995.
- SITNIKOVA, T.; RZHETSKY, A.; NEI, M. Interior-branch and bootstrap tests of phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v.12, n 2, p.319-333, 1995.
- SMART, R. E.; BINGHAM, G. E. Rapid estimates of relative water content. **Plant Physiology**, v.53, p. 258-260, 1974.
- SOUSA, J.B.; BRANCALION, A.P.S.; GROppo, M.; BASTOS, J.K. A Validated Chromatographic Method for the Determination of Flavonoids in *Copaifera langsdorffii* by HPLC. **Natural Product Communications**, v.7, p.25-28, 2012.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; GURGEL, E.S.C., QUEIROZ, M.S.M.; SANTOS, J.U.M. Atividade alelopática de extratos brutos de três espécies de *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Planta daninha**, v. 28, n. 4, p. 743-751, 2010 .
- TAIZ L.; ZEIGER E.; **Plant physiology**. 5ª Ed. Sinauer Associates, Inc.; 2010. 820p.
- TAYLOR, L.P.; GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, n.3, p.317–323, 2005.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL-W – Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.
- VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO. A.G. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v.25, n.2, p.237-286, 2002.

VERY, A.A.; DAVIES, J.M. **Hyperpolarization-activated calcium channels at the tip of Arabidopsis root hairs**. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, v.97, n 17, p.9801–9806, 2000.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**, 1stEd., Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1994, 356p.

ZHU, H.; HU, F.; WANG, R.; ZHOU, X.; SZE, S.H.; LIOU, L.W.; BAREFOOT, A.; DICKMAN, M.; ZHANG, X. *Arabidopsis* Argonaute10 Specifically Sequesters miR166/165 to Regulate Shoot Apical Meristem Development. **Cell**, v.145, n.2, p.242–256, 2011.

III - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados conclui-se que:

- O perfil fitoquímico dos extratos de folhas de *Copaifera langsdorffii* coletados em épocas seca e úmida, não demonstra mudanças qualitativas em sua composição, onde foi observado a presença de substâncias pertencente aos flavonoides e ácidos fenólicos.
- Apesar de não observarmos variação qualitativa nos extratos de *C. langsdorffii*, os ensaios biológicos de germinação e crescimento inicial de raiz, demonstraram potencial de inibição em sorgo, e raízes tratadas com extrato de época úmida apresentaram maior inibição do crescimento em relação às tratadas com extrato de época seca. O que indica que apesar dos extratos não demonstrarem variação qualitativa pode haver variação quantitativa nas substâncias que compõem os extratos, fazendo-se necessário quantificar as substâncias.
- Os extratos também apresentaram potencial de alteração da expressão dos genes SHR, miR166 e dos FT HD-ZIP III. Extratos de época úmida apresentam atividade nos níveis de expressão de SHR e miRNA 166, enquanto que os EES alteram fortemente os níveis de PHB.

IV - REFERÊNCIAS

ACHARD, P.; HERR, A.; BAULCOMBE, D.C.; HARBERD, N.P. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated MicroRNA. **Development**, v.131, p.3357-3365, 2004.

ARCT, J.; PYTKOWSKA K. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. **Clinics in Dermatology**. v. 26, n. 4, p.347-357, July-August 2008.

ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, *et al.* **Biologia molecular da célula**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1268p.

ALMEIDA, L.F.R.; SANOMIYA, M.; RODRIGUES, C.M.; DELACHIAVE, M.E.A.; MANCINE, E.; VILEGAS, W.; DE FEO, V. In vitro allelopathic effect of extracts from *Leonurus sibiricus* leaves. **Journal Plant Interact**. v.3,n.1,p.38-49, 2008.

ALMEIDA, L.F.R.; SANOMIYA, M.; RODRIGUES, C.M.; DELACHIAVE, M.E.A.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; DE FEO, V. In vitro allelopathic of extracts and amenthoflavone from *Byrsonima crassa*. **Journal Plant Interact**. v.2, n.2, p.121-124, 2007.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. 1ª Ed. Embrapa: Planaltina. 1998, 143p.

ALVES, M.C.S.; MEDEIROS, FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S.B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.39, p.1083-1086, 2004.

BAIS, H.P.; VEPACHEDU, R.; GILROY, S.; CALLAWAY, R.M.; VIVANCO, J.M. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules an genes to species interactions. **Science** v.301, p. 1377-1380, 2003.

BAERSON, S.R.; COOK, D.; DAYAN, F.E.; RIMANDO, A.M.; PAN, Z.; DUKE, S.O. The use of functional genomics to advance allelopathic science – investigating sorgoleone biosynthesis as an example. In FOURTH WORLD CONGRESS ON ALLELOPATHY, **Proceedings ...** International Allelopathy Society. 2005, pp. 191-196.

BARROS, F.M.C.; ZAMBARDA E.O.; HEINZMANN, B.M.; MALLMANN, C.A. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**. v.4, PP.861-867, 2009.

- BENINGER, C.W.; HALL, J.C. Allelopathic activity of luteolin 7-O- β -glucuronide isolated from *Chrysanthemum morifolium* L. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.33, p.103–111, 2005.
- BELZ, R.G. Allelopathy in crop/weed interactions – an update. **Pest Management Science**. v.63, p.308–326, 2007.
- BENFEY, P.N.; LINSTEAD, P.J.; ROBERTS, K.; SCHIEFELBEIN, J.W.; HAUSER, M.T.; AESCHBACHER, R.A. Root development in *Arabidopsis*: Four mutants with dramatically altered root morphogenesis. **Development**. v.119, p.57-70, 1993.
- BESSA, T.; HERNANDE-TERRONES, M.G.; SANTOS, D.Q. Avaliação fitoquímica e identificação de metabólitos secundários de raiz de *Cenchrus echinatus*. **Horizonte Científico** v.1, 2007.
- BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M.; Flavonoids as antioxidants: Determination of radical scavenging efficiencies. **Methods Enzymology**, v.186, p.343–355, 1990.
- BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M.G. CGAR e CGAR-EM na análise dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Sabastiania argutidens* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v.25, p.15-19, 2002.
- BRAZMA A; HINGAMP P; QUACKENBUSH J; SHERLOCK G; SPELLMAN P; STOECKERT C; AACH J; ANSORGE W; BALL CA; CAUSTON HC; GAASTERLAND T; GLENISSON P; HOLSTEGE FCP; KIM IF; MARKOWITZ V; MATESE JC; PARKINSON H; ROBINSON A; SARKANS U; SCHULZE-KREMER S; STEWART, J.; TAYLOR, R.; VILO, J.; VINGRON, M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. **Nature Genetics**, v.29, p.365 – 371, 2001.
- BUER, C.S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M.A. Flavonoids: new roles for old molecules **Journal of Integrative Plant Biology**, v.52, n.1, p.98–111, 2010.
- BUSA, W.B.; NUCCITELLI, R. Metabolic regulation via intracellular pH. **American Journal of Physiology**, v.246, p.409-38, 1984.

BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**. v.29, p.23-39, 2002.

CARLSBECKER, A.; LEE, J.; ROBERTS, C.J.; DETTMER, J.; LEHESRANTA, S.; ZHOU, J.; LINDGREN, O.; MORENO-RISUENO, M.A.; VATE'N, A.; THITAMADEE, S.; CAMPILHO, A., SEBASTIAN, J.; BOWMAN, J.L., HELARIUTTA, Y.; BENFEY, P.N. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. **Nature**, v. 465, p. 316-321, 2010.

CARUSO, A.; CHEFDOR, F.; DEPIERREUX, C.; DELMOTTE, F.M.; KAHLEM, G.; MORABITO, D. Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.165 p.932-941, 2008.

CETNARSKI FILHO R.; NOGUEIRA, A.C. Influência da temperatura na germinação de diásporos de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (canela-sassafrás). **Ciência Florestal**, v.5, p.191-198, 2005.

CHITWOOD, D.H.; GUO, M.; NOGUEIRA, F.T.S.; TIMMERMANS, M.C.P. Establishing leaf polarity: the role of small RNAs and positional signals in the shoot apex. **Development**, v.134, p.813-23, 2007.

COOK, D.; RIMANDO, A.M.; CLEMENTE, T.E.; SCHRÖDER, J.; DAYAN, F.E.; NANAYAKKARA, N.P.D.; PAN, Z.; NOONAN, B.P.; FISHBEIN, M.; ABE, I.; DUKE, S.O.; BAERSON, S.R. Alkylresorcinol Synthases Expressed in *Sorghum bicolor* Root Hairs Play an Essential Role in the Biosynthesis of the Allelopathic Benzoquinone Sorgoleone. **The Plant Cell**, v.22, p.867–887, 2010.

CUTLER, H.G.; CUTLER, S.J. Agrochemicals and Pharmaceuticals: The connection. In: . **Biologically active natural products: Agrochemicals**. Boca Raton, Florida, 1999. p.1-14.

CZECHOWSKI, T.; STIT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M.K.; SCHEIBLE, W. Genome-wild identification and testing of superior reference-genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.139, p.5-17, 2005.

DE MARTINO, L.; MENCHERINI, T.; MANCINI, E.; AQUINO, R.P.; ALMEIDA, L.F.R.; DE FEO, V. In Vitro Phytotoxicity and Antioxidant Activity of Selected Flavonoids. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p.5406-5419, 2012.

DELFINO, S.; LORETO, F.; PINELLI, P.; TOGNETTI, R.; ALVINO, A. Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and spearmint plants under water stress. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. v. 106, p. 243–252, 2005.

DOLAN, L.; JANMAAT, K.; WILLEMSSEN, V.; LINSTEAD, P.; POETHIG, S.; ROBERTS, K.; SCHERES, B. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. **Development**, v.119, p.71–84, 1993.

EINHELLIG, F.A.; RASMUSSEN, J.A. Synergistic inhibitory effects of vanillic and p-Hydroxybenzoic acids on radish and grain sorghum. **Journal of Chemical Ecology**, v.4, n.4, p.425-436.

ELSHEERY, N.I., CAO, E.K.F. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. *Acta Physiolog Plant*. v. 30. p. 769-777, 2008.

EMERY, J.F.; FLOYD, S.K.; ALVAREZ, J.; ESHED, Y.; HAWKER, N.P.; IZHAKI, A.; BAUM, S.F.; Bowman JL. Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. **Current Biology**, v.13, p.1768-1774, 2003.

EXPÓSITO-RODRIGUEZ, M.; BORGES, A.A.; BORGEZ-PÉREZ, A.; PÉREZ, J.A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, v.8, p.131, 2008.

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

GERSHENZON, J. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. **Recent Advances in Phytochemistry**, v.18, p.273–320, 1984.

GILLIES, R.J.; DEAMER, D.W. Intracellular pH changes during the cell cycle in *Tetrahymena*. **Journal of Cellular Physiology**, v.100, n.1, p.23-32, 1979.

GOLISZ, A.; SUGANO, M.; HIRADATE, S.; FUJII, Y. Microarray analysis of *Arabidopsis* plants in response to allelochemical L-DOPA. **Planta**, v.233, n.2, p.231–240, 2011.

GOLISZ, A.; SUGANO, M.; FUJII, Y. Microarray expression profiling of *Arabidopsis thaliana* L. in response to allelochemicals identified in buckwheat. **Journal of Experimental Botany**, v.59, n.11, p.3099–3109, 2008

GRAY, D.E.; PALLARDY, S.G.; GARRETT, H.E. & ROTTINGHAUS, G.E. Effect of acute drought stress and time of harvest on phytochemistry and dry weight of St. John's worth leaves and flowers. *Planta Medica*, v.69, pp.1024-1030, 2003.

HAMMOND-KOSACK K.E.; JONES J.D.G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAM, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville, Maryland: APS Press, 2000. p. 1102-56.

HARBORNE, J.B. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986, London: Chapman e Hall. **Phytochemical Analysis**, v.6, n.1, p.589-618, Jan-Feb 1995.

HARBONE, J.B. Chemotaxonomy of the Leguminosae. In: CODY, V.; MIDDLETON, E.; HARBONE, J.B. (Eds.), **The Flavonoids Advances in Research Since 1980**. London: Chapman e Hall. 1988. p.367-462.

HAWKER, N.P.; BOWMAN, J.L. Roles for Class III HD-Zip and KANADI Genes in *Arabidopsis* Root Development. **Plant Physiology**, v.135, n.4, p.2261–2270, 2004.

HEDRICH, R. Ion channels in plants. **Physiological Reviews**, v.92, n.4, p.1777–1811, Oct 2012.

HELARIUTTA, Y.; FUKAKI, H.; WYSOCKA-DILLER, J.; NAKAJIMA, K.; JUNG, J.; SENA, G.; HAUSER, M.T; BENFEY, P.N. The SHORT-ROOT Gene Controls Radial Patterning of the *Arabidopsis* Root through Radial Signaling. *Cell*, v. 101, p. 555-567, 2000.

HOAGLAND, R.E.; WILLIAMS, R.D. Bioassays-useful tools of the study of allelopathy. In: MACIAS, F.A. *et al.* (Eds.) **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, Florida: CRC Press. 2004. p.315-41.

INDERJIT, CALLAWAY, R.M.; VIVANCO, J.M. Can plant biochemistry contribute to understanding of invasion ecology? **Trends in Plant Science**, v.11, n.11, p.574-580, 2006.

- INDERJIT; DEL MORAL, R. Is separating resource competition from allelopathy realistic? **The Botanical Review**, v.63, n. 3, p.221-230, Jul-Sep 1997.
- JUAREZ, M.T.; KUI, J.S.; THOMAS, J.; HELLER, B.A.; TIMMERMANS, M.C.P. microRNA mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. **Nature**, v.428, p.84-88, 2004.
- KHALIQ, A.; MATLOOB, A.; KHAN, M.B.; TANVEER, A. Differential suppression of rice weeds by allelopathic plant aqueous extracts. **Planta daninha**, vol.31, n.1, p.21-28, 2013.
- KÜHNAU, J. The Flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World review of nutrition dietetics**, v.24, p.117-190, 1976.
- KURKDJIAN, A.; GUERN, J. Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, p.271-303, june 1989.
- LANGENHEIM, J.H. **Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology and Ethnobotany**. Cambridge: Timber Press. 2003. 378p.
- LEVESQUE MP.; VERNOUX, T.; BUSCH, W.; CUI, H.; WANG, J.Y.; BLILOU, I.; HASSAN, H.; NAKAJIMA, K.; MATSUMOTO, N.; LOHMANN, J.U.; SCHERES, B.; BENFEY, P.N. Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in *Arabidopsis*. **PLoS Biology**, v.4, n.5, e143, p. 739-749, 2006.
- Lobo, A.M.; Lourenço, A.M. **Biossíntese de produtos naturais**. Lisboa: IST Press. 2007. 276p.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa/SP: Plantarum. 2ª Ed. 2002, 349p.
- LU, S.; SUN, Y.H.; SHI, R.; CLARCK, C.; LI, L.; CHIANG, V.L. Novel and mechanical stress responsive miRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v.17, p.2186-2203, 2005.
- MACIAS FA.; MOLINILLO, J.M.G.; TORRES, A.; VARELA, R.M.; CASTELLANO, D. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. **Phytochemistry**, v.45, n.4, p.683–687, June 1997.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Potafos. 1997. 319p.

MALLORY, A.C.; BARTEL, D.P.; BARTEL, B. MicroRNA directed regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. **The Plant Cell**, v.17, n.5, p.1360-1375, Apr 2005.

MANAVELLA, P.A.; WEIGEL, D.; WU, L. Argonaute10 as a miRNA Locker. **Cell**, v.145, p.173–174, Apr 2011.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M.E.A. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **Revista Árvore**, v.30, n.4, p.547-555, 2006.

MARÓSTICA JUNIOR, M.R. **Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais**. 2006. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas -SP. 2006.

MATHELA, C.S. Allelochemicals in Medicinal and Aromatic Plants. In: NARWAL, S.S.; TAURO, P. (Eds.) Allelopathy in Agriculture and Forestry. **Jodhpur, India: Scientific Publishers**, 1991, p.213-228.

MOREIRA, P.F.S.D.; SOUZA, D.R.; TERRONES, M.G.H. Avaliação do potencial alelopático do extrato metanólico obtido das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi) na inibição do desenvolvimento da raiz em sementes de *Panicum maximum*. **Bioscience Journal**, v.24, n.3, p.74-79, 2008.

NAQVI, A.R., SARWAT, M., HASAN, S., ROYCHODHURY, N. Biogenesis, functions and fate of plant microRNAs. **J Cell Physiol**. v.227, n.9, p. 3163-8, 2012

NAKAJIMA, K.; SENA, G.; NAWY, T.; BENFEY, P.N. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. **Nature**, v.413, p.307–311, 2001.

NDAMBA, J.; LEMMICH, E.; MØLGAARD, P. Investigation of the diurnal, ontogenetic and seasonal variation in the molluscicidal saponin content of *Phytolacca dodecandra* aqueous berry extracts. **Phytochemistry**, v.35, pp.95–99, 1994.

NOGUEIRA, F.T.S.; MADI, S.; CHITWOOD, D.H.; JUAREZ, M.T.; TIMMERMANS, M.C.P. Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. **Genes & Development**, v.21, p.750-755, 2007.

OHORI-IHARA Y.; NAGANO, M.; MUTO, S.; UCHIMIYA H.; KAWAIYAMADA, M. Cell death suppressor *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 is associated with calmodulin binding and iron homeostasis. **Plant Physiology**, v.143, p.650-60, 2007.

OLIVEIRA P.S.; MARQUIS, R.J. **The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna**. Columbia University Press: New York. 1ªEd. 2002. 289p.

OTEIZA, P.I.; ERLEJMAN, A.G.; VERSTRAETEN, S.V.; KEEN, C.L.; FRAGA, C.G. Flavonoid–membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? **Clinical & Developmental Immunology**, v.12, n.1, p.19-25, 2005.

OTSUGA, D.; DEGUZMAN, B.; PRIGGE, M.J.; DREWS, G.N.; CLARK, S.E. REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. **The Plant Journal**, v.25, n.2 p.223-236, Jan 2001.

PACE-ASCIAK, C.R. et al. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis implication for protection against coronary heart disease. **Clinical Chemistry Acta**, v.235, p.207-219, 1995.

PALÁ-PAÚL, J.; PÉREZ-ALONSO, M. J.; VELASCO-NEGUERUELA, A.; PALÁ- PAÚL, R.; SANZ, J.; CONEJERO, F. Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *Rosmarinifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, pp.652-663, 2001.

PANNACCI, E.; BARTOLINI, S.; COVARELLI G. Chemical weed control in biomass sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Agric Segment**, v.1, n.1, 2010

PARVEZ M.M. et al. Effects of quercetin and its seven derivatives on the growth of *Arabidopsis thaliana* and *Neurospora crassa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.631–635, 2004.

PATERSON, A.H.; BOWERS, J.E.; BRUGGMANN, R.; et al. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. **Nature**, v.457, p.551-556, 2009.

PATTERSON, K.D.; CLEAVER, O.; GERBER, W.V.; WHITE, F.G.; KRIEG, P.A. Distinct expression patterns for two *Xenopus* Bar homeobox genes. **Development Genes and Evolution**, v. 210, p. 140–144, 2000.

PEER, W.A.; MURPHY, A.S. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? **Trends in Plant Science**, v.12, n.12, p.556–563, Dec 2007.

PETRICKA, J.J., SCHAUER, M.A., MEGRAW, M., BREAKFIELD, N.W., THOMPSON, J.W., GEORGIEV, S., SODERBLOM, E.J., OHLER, U., MOSELEY, M.A., GROSSNIKLAUS, U., BENFEY, P.N.. The protein expression landscape of the *Arabidopsis* root. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v.109, p. 6811-8, 2012.

PIETTA, P.G.; SIMONETTI, P. **Antioxidant Food Supplements in Human Health**. San Diego: Academic Press, 1999, p.283-308.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, n.1, p.45-61, May 2002.

PFAFFL, M.W.; HAGELEIT, M. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. **Biotechnology Letters**, v.23, p.275-282, 2001.

POPESCU, S.C.; POPESCU, G.V.; ZHANG, Z.; SEAY, M.S.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M.; DINESHKUMAR, S.P. Differential bindings of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density *Arabidopsis* proteins microarrays. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, n.11, p.4730-4735, Feb 2007.

PRATES, H.T.; PAES, J.M.V.; PIRES, N.M.; PEREIRA FILHO, I.A.; MAGALHÃES, P.C. Efeito do extrato aquoso de *Leucena* na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 909-14, 2000.

PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. **The Science of allelopathy**: John Wiley e Sons. 1986. 317p.

RAVEN, J.A.; SMITH, F.A. Significance of hydrogen ion movement in plant cells. **Canadian Journal of Botany**, v.52, n.5, p.1035-1049, 1974.

- REBRIKOV, C.V.; TROFIMOV, D.Y. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.42, n.5, p.455-463, 2006.
- RESENDE, L.V.; BARRETTI, P.B.; MEDEIROS, F.C.L.; SILVA, D.D.; PEREIRA, R.B.; LINS, S.R.O.; PEREIRA, L.M.; CAMPOS, M.A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **RAPP**. v.15, p.129-198, 2007.
- RIBEIRO, J.F., WALTER, B.M.T., 1998. **Fitofisionomias do bioma Cerrado**. IN: SANO, S.M., ALMEIDA, S.M, (Eds.), **Cerrado: ambiente e flora**. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, pp.89-166. Schiefelbein et al., 1997
- RICE, E.L. **Allelopathy**. 2ª Ed. Orlando, Florida: Academic Press. 1984. 422p.
- RICE – EVANS, C.A.; PACKER, L. **Flavonoids in health and disease**. New York: Marcel Dekker. 1998. p.447-467.
- RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. **Allelopathy: Basic and Applied aspects**. London: Chapman e Hall. 1992. 480p.
- ROOS, A.; BORON, W.F. Intracellular pH. **Physiological Reviews**, v.61 n.2, p.269-434, 1981.
- ROZETE, M.B.V.; OLIVEIRA, P.A.; GUSMAN, G.S.; VALENTIM, J.M.B.; VESTENA, S.; BITTENCOURT, A.H.C. Avaliação do Efeito Alelopático de Extratos Aquosos de *Bacharis dracunculifolia* DC. Sobre a Germinação e o Crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Brassica oleraceae* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p. 513-515, Jul 2007.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, n.4 p.406-425, 1987.
- SANTANA, D.G.; RANAL, M.A.; MUSTAFA, P.C.V.; SILVA, R.M.G. Germination measurements to evaluate allelopathic interactions. **Allelopathy Journal**, v.17, n.1, 43-52, Oct 2006.
- SCHERES, B.; WOLKENFELT, H.; WILLEMSSEN, V.; TERLOUW, M.; LAWSON, E.; DEAN, C.; WEISBEEK, P. Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials. **Development**, 120, p. 2475-2487, 1994.

SCHERES, B.; DI LAURENZIO, L.; WILLEMSSEN, V.; HAUSER, M.T.; JANMAAT, K.; WEISBEEK, P.; BENFEY, P.N. Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. **Development**, v.121, p.53–62, 1995.

SCHIEFELBEIN, J.W., MASUCCI, J.D., AND WANT, H. Building a Root: The Control of Patterning and Morphogenesis during Root Development. *The Plant Cell*, v. 9, p. 1089-1098.

SCHON, M.K.; EINHELLIG, F.A. Allelopathic Effects of Cultivated Sunflower on Grain Sorghum. **Botanical Gazette**, v,143, n.4, p.505-510, 1982.

SILVA, R. M. G.; SANTOS, V.H.M.; BORGES, F. M.; MELO, F. F. Q.; SILVA, L P. Potencial alelopático e levantamento do banco natural de sementes em amostras de solo coletadas sob a copa de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 641-653, 2012.

SITNIKOVA, T.; RZHETSKY, A.; NEI, M. Interior-branch and bootstrap tests of phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v.12, n 2, p.319-333, 1995.

SMART, R. E.; BINGHAM, G. E. Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiology*, v. 53, p. 258-260, 1974.

SMITH, F.A.; RAVEN, J.A.; Intracellular pH and its regulation. **Annual Review of Plant Physiology**, v.30, p.289-311, Jun 1979.

SOUSA, J.B.; BRANCALION, A.P.S.; GROppo, M.; BASTOS, J.K. A Validated Chromatographic Method for the Determination of Flavonoids in *Copaifera langsdorffii* by HPLC. **Natural Product Communications**, v.7, p.25-28, Jan 2012.

SOUZA FILHO, A.P.S.; GURGEL, E.S.C.; QUEIROZ, M.S.M.; SANTOS, J.U.M. Atividade alelopática de extratos brutos de três espécies de *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinioideae) **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 28, n. 4, p. 743-751, 2010.

TAIZ L; ZEIGER E; **Plant physiology**. 5ª Ed. Sinauer Associates, Inc.; Fifth edition. 2010. 820p.

TAYLOR, L.P.; GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, n.3, p.317–323, Jun 2005.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL-W – Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.

VARKONYI-GASIC, E.; WU, R.; WOOD, M.; WALTON, E.F.; HELLENS, R.P. A highly sensitive RTPCR method for detection and quantification of microRNAs. **Plant Methods**, v. 3, p.12, 2007.

VAUCHERET H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev* 20:759-771. Veiga Jr. e Pinto, 2002;

VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO. A.G. O Gênero Copaifera L. *Química Nova*, v.25, n.2, p.237-286, 2002.

VERY, A.A.; DAVIES, J.M. Hyperpolarization-activated calcium channels at the tip of Arabidopsis root hairs. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.97, n 17, p.9801–9806, 2000.

VIEGAS JUNIOR C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v.26, n.3, p.390-400, 2003.

VOINNET, O. Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. **Cell**, v. 136, p. 669–687, 2009.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**, 1ªEd., Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1994, 356p.

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E.L.; BOVERIS, A. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. In: CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. **Flavonoides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas**. (Eds.). Ed. Argos: Chapecó/SC. 2001. p. 317-334.

WILLIAMS, C.A.; GRAYER, R.J. Anthocyanins and other flavonoids. **Natural Product Reports**, v.21, n.4, p.539–573, 2004.

XU, X.; YANG, F.; XIAO, X.; SHANG, S.; KORPELAINEN, H.; LI, C. Sex-specific responses of *Populus cathayana* to drought and elevated temperatures. **Plant Cell Environmental**, v. 31, p. 850-860, 2008.

YANG, Z.Y.; EBRIGHT, Y.W.; YU, B.; CHEN, X.M. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. **Nucleic Acids Research, Oxford**, v. 34, n. 2, p. 667-657, 2006.

YANG, K.; LAMPRECHT, S.A.; LIU, Y. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. **Carcinogenesis**, v.21, p.1655-1660, 2000.

YU, N.; CAI, W.J.; WANG, S.; SHAN, C.M.; WANG, L.J.; CHEN, X.Y. Temporal control of trichome distribution by microRNA 156 – Targeted SPL Genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, v. 22, n. 7, p. 2322-2335, Jul 2010.

ZHONG, R.; YE, Z.H. Regulation of cell wall biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 564-572, 2007.

ZHU, H.; HU, F.; WANG, R.; ZHOU, X.; SZE, S.H.; LIOU, L.W.; BAREFOOT, A.; DICKMAN, M.; ZHANG, X. *Arabidopsis* Argonaute10 Specifically Sequesters miR166/165 to Regulate Shoot Apical Meristem Development. **Cell**, v.145, n.2, p.242–256, 2011.