



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MATIAS KÖHLER

Fitotoxidez do óleo essencial de *Baccharis psiadioides* (Less.) Joch. Mull.
(Asteraceae: Asterae) na germinação de sementes: relações com o tamanho das
sementes

Porto Alegre (RS), Brasil

Março de 2017

Fitotoxidez do óleo essencial de *Baccharis psiadioides* (Less.) Joch. Mull.
(Asteraceae: Asterae) na germinação de sementes: relações com o tamanho das
sementes

MATIAS KÖHLER

Dissertação de Mestrado apresentada à Banca Examinadora designada pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica, do Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientador: Dr. Geraldo Luiz Gonçalves Soares

Banca Examinadora:

Dr^a. Ângela Pawlowski (IFFarroupilha)

Dr. Antonio Carlos Silva de Andrade (JBRJ)

Dr. Felipe dos Santos Maraschin (UFRGS)

Porto Alegre (RS), Brasil

Março de 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Köhler, Matias

Fitotoxidez do óleo essencial de *Baccharis psiadioides* (Less.) Joch. Mull. (Asteraceae: Asterae) na germinação de sementes: relações com o tamanho das sementes / Matias Köhler. -- 2017.
44 f.

Orientador: Geraldo Luiz Gonçalves Soares.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. alelopatia. 2. análises de dose-resposta. 3. inibição de germinação. 4. ecologia de sementes. 5. ecologia química. I. Luiz Gonçalves Soares, Geraldo, orient. II. Título.

Dedico:

às plantas, que tornam boa parte da vida possível e encantadora;
às sementes, que guardam em si um universo em potencial;
à minha filha, Mônica, que germinou em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha família: Estela, Mônica e Marlene, pela paciência, compreensão, estímulo, incentivo e descontrações;

Aos meus pais, Ricardo e Mirna, que apesar de tudo, tanto contribuíram para minha formação;

À cazaque Alexandra Elbakyan, pela inspiração, admirável posicionamento sobre o papel da ciência na sociedade, e pela oportunidade de acessar tantos artigos necessários para melhor desenvolvimento deste trabalho;

Aos professores do PPG-Botânica, com quem tive a oportunidade de sempre aprender um pouco mais, compartilhar dúvidas e ensinamentos, encantamentos pela Botânica, e tantos outros apreços: Arthur G. Fett-Neto, Ilsi I. Boldrini, Silvia T. Sfoggia Miotto, Tatiana T. Souza Chies, João A. Jarenkow, Jorge L. Waechter, Mónica Cadenazzi (Udelar), Mara R. Ritter, Gustavo Heiden, João R.V. Iganci;

Aos membros do Laboratório de Ecologia Química e Quimiotaxonomia da UFRGS, pela companhia, cumplicidade e fortuitas discussões;

Aos colegas, de curso, laboratório ou de paixão pelas plantas e campeiradas, por tornarem mais saudável o ambiente e compartilharem tantas aspirações: Cachopa (Rodrigo Ardisson), Japa (Anderson S. Mello), Guilherme Krahl, Ane (Eliane R. Silva), Carlito (Carlos V.E. Carvalho), Cássio Rabuske, Luhen (Luís H.R. Silveira) e outr@s que cometo o grave erro de não citar;

Às duas pessoas que são minhas referências, que, aos poucos, foram me apresentando a Botânica como eu não conhecia, e me fizeram conhecer e me apaixonar, para então adentrar este caminho: professor, hoje amigo, Paulo Brack, e o colega, Martin Grings. Pessoas que vão muito além da Botânica, e tanto ensinam. E aos colegas do GVC, que trilham este e outros caminhos, vivenciando o viveirismo, semeando tantas sementes e colhendo muitos frutos;

À CAPES, e tod@s brasileir@s contribuintes, pelo financiamento da ciência no país, e minha bolsa de mestrado em particular, mesmo com a mixaria do orçamento que sobra dos desvios e roubos do colarinho branco.

À UFRGS, PPG-Botânica, e tod@s servidores, técnicos e demais funcionários, pela dedicação para funcionamento de todo ambiente de trabalho;

Às sementes, que dedicaram toda sua energia para este estudo.

Enfim, agradeço.

Sedução Vegetal*

(Marina Gavaldão e Karine Faleiros)

Polinização, mutualismo; coevolução e a dispersão...

As espécies deslumbrantes da Floresta Tropical
Interagem constantemente: é planta, é animal
Através de interações bióticas, específicas e fundamentais
Não garantem, mas sustentam:

Diversificação
Polinização, mutualismo; coevolução e a dispersão
E a predação
Controla o nível da população

Já dizia Janzen-Connell: ao redor da planta mãe
Não restará nenhum filho pra contar a história.
A partir daí, outras plantas se estabelecerão
De outra espécie ou de outra geração.

Os bichinhos fazem bem sua função
São atraídos ou repelidos por cheiros, flores, formas, frutos
E coloração...
São capazes de voar, correr, pular quilômetros pra se alimentar
Enquanto isso levam o pólen e as sementes prá lá e prá cá

O vento vai, a água vem
E o pólen, principalmente, as sementes vão também

É a ponta do iceberg, é a ponta do bico do beija-flor
É o meio da flor mais linda
É o fluxo gênico meu amor

Vem polinizar, pode vir que tem
Eu sou uma planta co-evoluída com você meu bem
Vamos interagir, pode vir que eu dou
Meu material genético amor
Eu sou a semente, você vai me levar
Quebra minha dormência que eu quero germinar

Amor... Amor...
Seja por morcego, passarinho, paca, anta, vento ou disco voador
Amor, Amor, Amor... Amor, Amor, Amor... Amor, Amor, Amor...
Seja por morcego, passarinho, paca, anta, vento ou disco voador
Amor, Amor, Amor... Amor, Amor, Amor... Amor, Amor, Amor...
Seja por morcego, passarinho, paca, anta, vento ou disco voador

*Música composta por alunas do Prof. Paulo Kageyama (*in memoriam*), em profunda
inspiração após suas aulas de ecologia. Emocionado, ele passou a usá-las em suas aulas.
Assim seguiremos.

RESUMO

Este trabalho visa preencher uma lacuna acerca do conhecimento dos efeitos fitotóxicos de óleos essenciais sobre a germinação de sementes. Especificamente, investigamos a possível relação do tamanho das sementes com a suscetibilidade aos efeitos fitotóxicos de um óleo essencial. Para tanto, um estudo em laboratório foi conduzido para determinação da sensibilidade de 21 acessos de sementes, variando em sua massa, ao efeito fitotóxico do óleo essencial de *Baccharis psiadioides* (Less.) Joch. Mull. durante a germinação. Cada acesso foi submetido a uma bateria de experimentos de dose-resposta, sendo seu nível de inibição calculado pela média da dose efetiva de inibição (ED_{50}), que corresponde àquela dose de óleo essencial capaz de inibir a germinação de 50% da população de sementes de cada acesso comparado ao seu controle. Resultados mostraram uma correlação positiva entre o tamanho da semente e a ED_{50} . As sementes menores necessitaram menores dosagens de óleo essencial para inibir a germinação, enquanto sementes maiores necessitaram uma maior dose de óleo essencial para inibição. Este padrão tem sido reportado para fitotoxinas em extratos aquosos com isoflavonoides, isotiocianatos, cumarinas e, agora, são reportados para óleos essenciais derivados de terpenos. Estes resultados trazem novas evidências sobre a ação de fitotoxinas e sua relação com o tamanho das sementes alvo de fitotoxidez, permitindo maior generalização acerca do tema e potenciais aplicações do conhecimento.

Palavras-chave: alelopatia; análises de dose-resposta; ecologia de sementes; ecologia química; inibição de germinação; terpenos.

ABSTRACT

This work aims to contribute to a better understanding of phytotoxic effects from essential oils on seeds germination. Specifically, the relationship between seed size and susceptibility to phytotoxic effects from an essential oil was investigated. A laboratory bioassays was conducted to determine the susceptibility of 21 seeds accessions, varying in their mass, to phytotoxic essential oil of *Baccharis psiadioides* (Less.) Joch. Mull. (Asteraceae) during germination. Each accession were submitted to dose-response experiments, and had its germination inhibition level by the essential oil calculated with the median effective dose (ED₅₀), which corresponds to that dosage of essential oil capable of inhibiting the germination of 50% of the population compared to the control of each accession. Results showed a positive correlation between seed size and ED₅₀. Small-seeded accessions needed lower dosages of essential oil to inhibit germination whereas larger-seeded accessions required higher doses for inhibition of germination. These pattern has been reported for phytotoxins in aqueous extracts with isoflavonoids, phenolic acid derivatives, isothiocyanates, coumarins and are now observed for essential oil derived from terpenoid pathway. These results provide new evidences on the action of phytotoxins and their relation with seed size and seed ecology, allowing broad generalization and potential applications. Effects reported herein may be a pattern for action of other essential oils, however, others studies may be conducted relating other seed attributes as seed reserve or embryo size.

Keywords: allelopathy; dose-response analysis; chemical ecology; germination inhibition; seed ecology; terpenes.

APRESENTAÇÃO

Nos últimos anos, o potencial alelopático e o efeito fitotóxico do óleo essencial de diversas espécies aromáticas têm sido investigados pelo Laboratório de Ecologia Química e Quimiotaxonomia (LEQTAX) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Schmidt-Silva et al., 2011; Pawlowski et al., 2012; Pawlowski et al., 2013; Lazarotto et al., 2014; Silva et al., 2014; Silva et al., 2015; Lazarotto et al., 2017). Nesses estudos, o principal método utilizado é a análise do efeito do óleo essencial sobre a germinação de sementes de espécies vegetais e sobre o crescimento inicial das plântulas. Contudo, via de regra, esse método tem sido aplicado a um pequeno espectro de espécies, sendo utilizado principalmente alface (*Lactuca sativa* L.) e cebola (*Allium cepa* L.) como espécies indicadoras da toxicidade dos óleos.

Nesse sentido, ainda existe uma lacuna sobre o real potencial alelopático e o efeito fitotóxico dos óleos essenciais, considerando a variedade e diversidade de possíveis sementes alvos destas substâncias. De modo que algumas questões emergem: será que outras espécies também possuem sensibilidade ao efeito fitotóxico dos óleos testados? Será que as sensibilidades são diferentes entre diversas espécies submetidas ao mesmo fitotóxico? O que pode estar relacionado com esta diferença?

Considerando isto, o presente estudo foi concebido. Ele é resultado do acúmulo de pesquisas que vêm sendo desenvolvidas pelo LEQTAX, e visa dar continuidade ao entendimento dos fenômenos da ecologia química e ecologia de sementes relacionados aos óleos essenciais.

Nas primeiras páginas, uma introdução geral sobre aspectos da germinação de sementes e fatores relacionados com este processo é apresentada, contextualizando com o estudo conduzido. Posteriormente, os resultados e discussões deste trabalho são apresentados em forma de artigo científico, a ser submetido para publicação em periódico específico. E, por último, considerações finais são tecidas e sintetizadas.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	01
1.1 Objetivo e estrutura da dissertação	08
2 CAPÍTULO ÚNICO / ARTIGO	09
Seed size is correlated with susceptibility to phytotoxic effects of an essential oil during germination	
Abstract	09
2.1 Introduction	10
2.2 Materials and methods	11
2.2.1 Seeds.....	11
2.2.2 Plant material and essential oil.....	12
2.2.3 Bioassays.....	12
2.2.4 Data analysis.....	13
2.3 Results and Discussion	14
2.4 Acknowledgements	20
2.5 Financial support	20
2.6 Conflict of interest	20
2.7 References	20
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
5 APÊNDICES	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais eventos da germinação e do crescimento da plântula relacionados com o tempo e a quantidade de água absorvida pela semente. A Fase I inicia com a embebição do diásporo pela água, com um rápido incremento deste componente, além do início da respiração celular, multiplicação e reparo de mitocôndrias, tradução e degradação de RNAm armazenados e a transcrição e tradução de novos RNAm. Na Fase II há pouca mudança na quantidade de água contida no diásporo, sendo que os demais eventos continuam em andamento, com alguma mobilização de reserva para crescimento e divisão celular, que culmina com a emergência da radícula, encerrando a Fase II. A Fase III já é concebida como um evento pós-germinação, no qual há o crescimento da plântula com grande mobilização e degradação das reservas. Imagem retirada de Bewley et al. (2013).....2

Figura 2. Esquema de fatores (bióticos e abióticos) que podem influenciar o processo de germinação e dormência de sementes. Clima (temperatura, precipitação, luminosidade) e características físicas do solo (granulometria, topografia) determinam a zona microclimática da semente. O microclima controla a dormência e germinação da semente. Atributos físicos da semente (permeabilidade do tegumento, tamanho) podem mitigar o efeito microclimático. O estado fisiológico da semente, incluindo herança genética e maternal, pode influenciar o nível de dormência da semente. Fatores biológicos, como patógenos, insetos e fitotoxinas também podem atuar no processo de germinação. Imagem retirada de Bewley et al. (2013).....4

Figura 3. (Capítulo I) Mean ED₅₀ from smaller and larger seeds groups in box plot with upper and lower limits from each group. Groups differed significantly according to PERMANOVA with randomization at $p < 0.001$ level.....15

Figura 4. (Capítulo I) Effective essential oil dosage (ED₅₀) of each accessions as a

function of seed mass. Twenty one accessions differing in their seed size were exposed to a dose-response experiment to determine essential oil dose capable inhibit germination of 50 % of population compare to each control treatment. See text for methods of bioassays, calculating ED₅₀ and data analysis.....16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. (Capítulo I) Seed species used in bioassays with respective botanical family, hundred seed mass (mg), moisture content and ED50 calculated.....18

Tabela 2. (Apêndices) Details from origin of each accessions used in the study.....29

1 INTRODUÇÃO GERAL

A germinação de sementes compreende um importante evento no ciclo de vida de espécies vegetais que dependem deste meio de propagação. Além do valor intrínseco e indissociável para a manutenção da vida de espécies vegetais, a germinação também assume relevante papel para a manutenção das atividades humanas na economia e na agricultura, além de ser fundamental para propiciar serviços ambientais ao estruturar populações, comunidades e ecossistemas.

De fato, o surgimento de sementes foi um dos principais fatores responsáveis pela transição de dominância das plantas com sementes – primeiro Gimnospermas e, atualmente, Angiospermas –, que evoluíram ao longo de várias centenas de milhões de anos (Karasawa, 2009; Linkies et al., 2010). Tal sucesso é atribuído ao fato das sementes armazenarem nutrientes que se tornam disponíveis ao embrião em estágios críticos da germinação e do estabelecimento inicial da plântula, sendo esta uma importante vantagem seletiva em relação aos grupos ancestrais relacionados que possuem esporos livres (Doyle, 2006; Raven, 2007).

A germinação pode ser concebida de diferentes maneiras, de acordo com o fim que se leva em conta. Em *sensu stricto*, podemos sintetizá-la como um ordenado e complexo processo morfofisiológico que leva ao crescimento do embrião quiescente até a protrusão de uma parte sua, normalmente a radícula, que rompe a estrutura envolvente da semente (Bewley and Black, 1994; Bewley, 1997; Bewley et al. 2013). Este é o sinal visual da germinação, por isso concebida como “germinação visível”. Quando o interesse é agrônômico ou restrito aos fenômenos bioquímicos, diferentes concepções podem ser adotadas para a germinação, conforme Ferreira and Borghetti (2004) discutem brevemente.

Independentemente da concepção adotada, o primeiro evento que leva a semente à germinação, mas não determinante, é a embebição d'água, que ocorre em três fases (Figura 1). A água, ao interagir com a superfície da semente, e entrar por regiões específicas do micrópila ou do hilo, interage com canais proteicos específicos das membranas celulares (aquaporinas), e propicia condições para reativação do metabolismo latente no diásporo (Obroucheva, 2013; Maurel et al., 2015). Destaca-se o importante papel da água em reconfigurar estruturas proteicas, enzimáticas e outros componentes celulares que antes estavam danificados pelo processo de dessecação ocasionado na formação e maturação das sementes (Benech-Arnold

and Sánchez, 2010; Bewley et al., 2013). Além disso, a água atua como agente solubilizante e transportador de íons e demais integrantes celulares fundamentais para o andamento do processo de germinação (Bewley and Black, 1982; Vázquez-Ramos and Sánchez, 2003).

Após a embebição, uma complexa sequência de eventos é ativada, ocorrendo drásticas mudanças celulares que levarão ao crescimento do embrião. De maneira breve e generalizada, cita-se o reparo e a multiplicação de mitocôndrias, a respiração celular, o reparo do ADN (Ácido Desoxirribonucleico – DNA), a tradução e degradação de RNAm (Ácido Ribonucleico Mensageiro – RNAm) armazenados, transcrição e tradução de novos RNAm, a mobilização e degradação de reservas, divisões celulares e crescimento celular até a emergência da radícula e posterior crescimento da plântula (Bewley, 1997; Bewley et al. 2013; Miransari and Smith, 2014; Han and Yang, 2015).

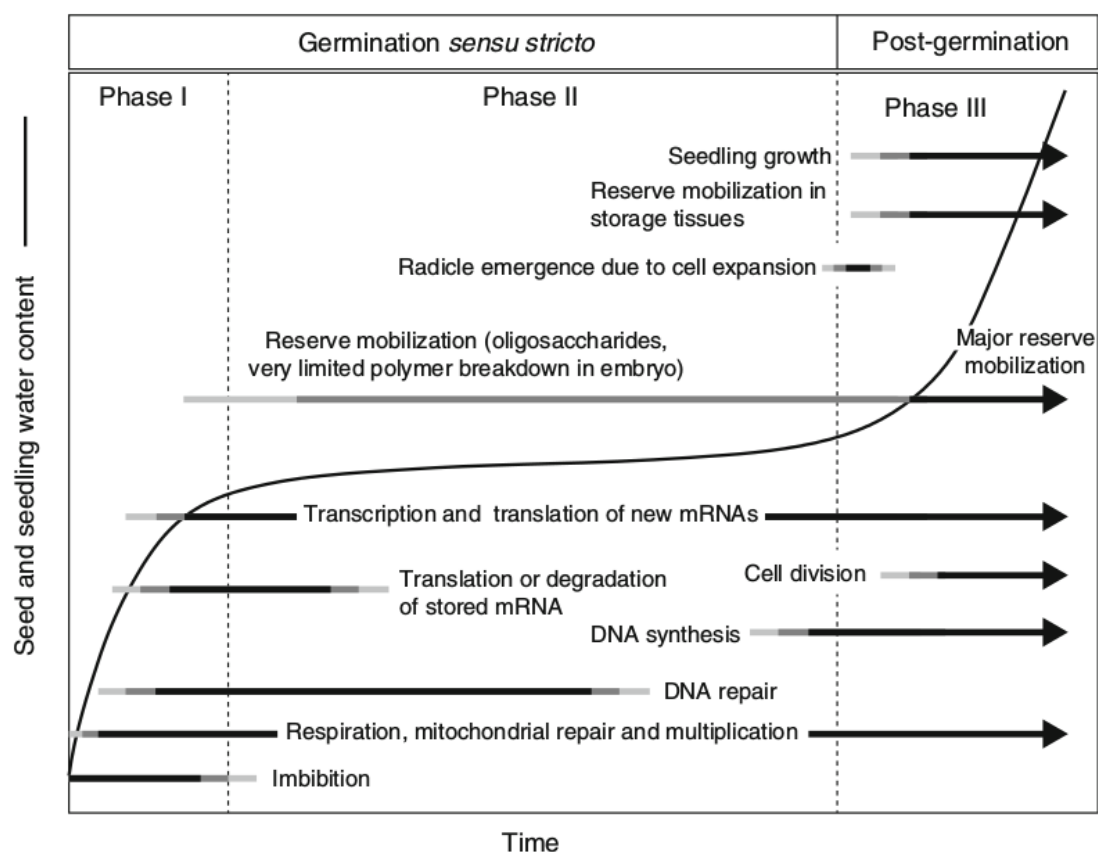


Figura 1: Principais eventos da germinação e do crescimento da plântula relacionados com o tempo e a quantidade de água absorvida pela semente. A Fase I inicia com a embebição do diásporo pela água, com um rápido incremento deste componente, além do início da respiração celular, multiplicação e reparo de mitocôndrias, tradução e degradação de RNAm armazenados e a transcrição e tradução de novos RNAm. Na Fase II há pouca mudança na quantidade de água contida no diásporo, sendo que os demais eventos continuam em andamento, com alguma mobilização de reserva para crescimento e divisão celular, que culmina com a emergência da radícula, encerrando a Fase II. A Fase III já é concebida como um evento pós-germinação, no qual há o crescimento da plântula com grande mobilização e degradação das reservas. Imagem retirada de Bewley et al. (2013).

Além da água, diversos outros fatores atuam durante o processo da germinação, de modo que podem influenciar o processo. De maneira didática, podem ser divididos em fatores intrínsecos ou fatores extrínsecos. Os fatores intrínsecos estão relacionados às características da semente em si, como herança genética, grau de maturidade, dormência, vigor, tamanho do diásporo, capacidade de sintetizar e regular hormônios (principalmente ácido giberélico, ácido abscísico, etileno e auxina) e todo metabolismo associado ao processo da germinação (Filho, 2005; Miransari and Smith, 2014; Han and Yang, 2015); enquanto os fatores extrínsecos estão relacionados às condições ambientais (bióticas ou abióticas) que podem atuar como reguladoras, influenciando positiva ou negativamente o processo de germinação (Figura 2). Dentre os fatores extrínsecos, certamente, disponibilidade hídrica, temperatura e luz são os fatores abióticos mais explorados e documentados em experimentos na literatura científica, sendo estudados seus efeitos em diferentes quantidades e intensidades, isolados e em conjunto, específica e generalizadamente (Arditti, 1967; Bewley and Black, 1982; Copeland and McDonald, 1995; Bewley, 1997; Vázquez-Ramos and Sánchez, 2003; Bewley et al., 2013; Fernando et al., 2016; Wang et al., 2016).

Os efeitos de fatores bióticos na germinação têm sido investigados, em especial, sob viés ecológico ou aplicado (Putnam and DeFrank, 1983; Reigosa et al., 1999; Einhellig et al., 2002; Inderjit et al., 2008). Nesse sentido, destacam-se estudos de alelopatia, que investigam a ação de metabólitos secundários (aleloquímicos) produzidos por organismos biológicos que, ao serem expostos e interagir com outros sistemas biológicos, podem inibir determinados processos bioquímicos causando alterações no funcionamento que era esperado, no caso, a germinação (Reigosa et al., 1999; Macías et al., 2003; Reigosa et al., 2006; Scognamiglio et al., 2013).

O mecanismo de ação dos aleloquímicos sobre as plantas, de modo geral, ainda não é compreendido de forma íntegra, sendo especialmente difícil distinguir um efeito primário, causado exclusivamente pela ação da fitotoxina, de um efeito secundário, causado de maneira indireta. Diversos efeitos já foram evidenciados em bioensaios sobre a germinação de sementes ou crescimento de plantas suscetíveis a fitotoxinas, como a inibição de fotossíntese em componentes do fotossistema II, interrupção de respiração e síntese de ATP, alteração da fluidez das membranas, geração de radicais livres, inibição da desmontagem dos microtúbulos durante a divisão celular, dentre outros (Einhellig et al., 1993; Lotina-Hennsen et al., 2006; Macías et al., 2003; Weir et al., 2004).

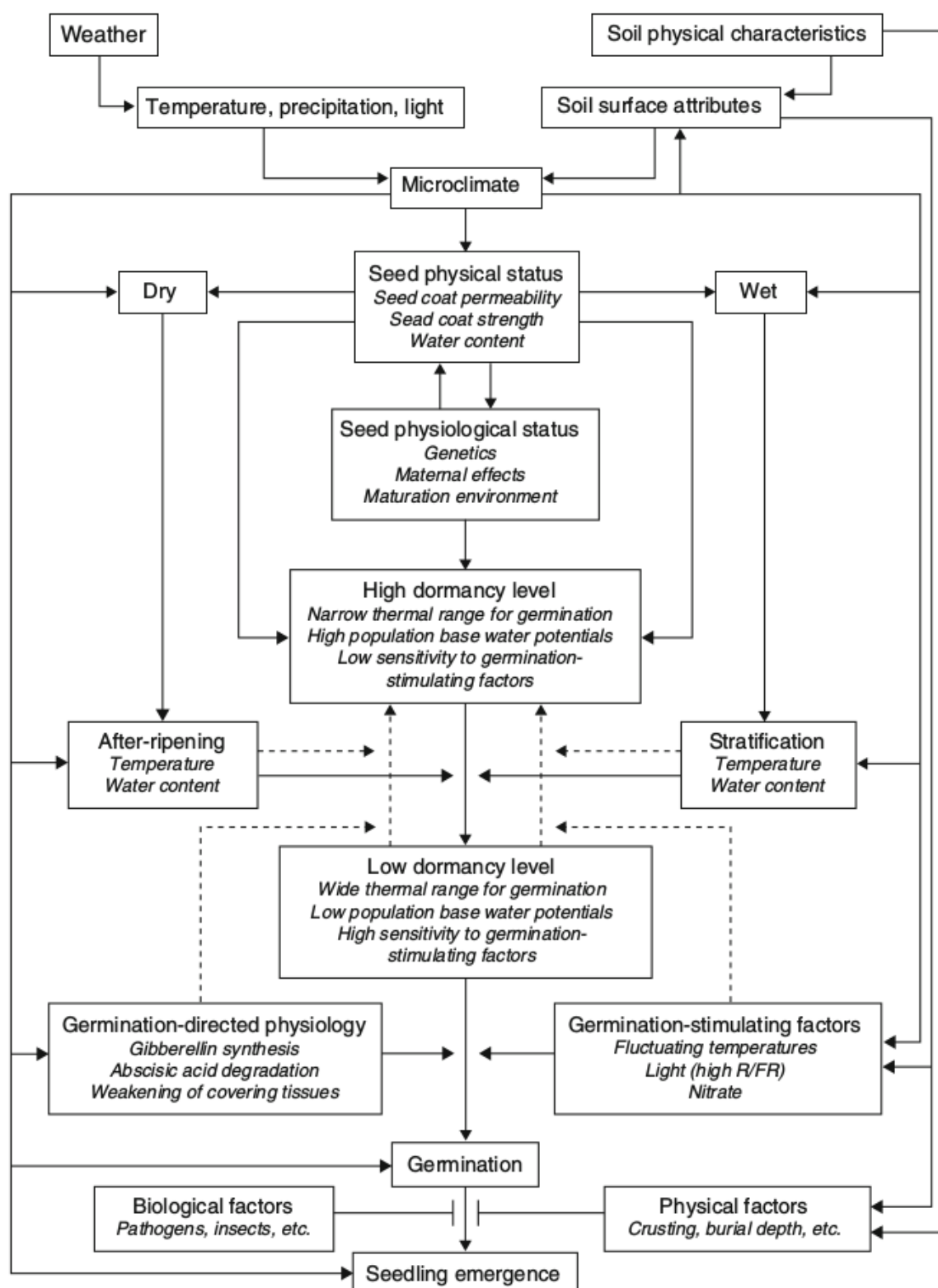


Figura 2: Esquema de fatores (bióticos e abióticos) que podem influenciar o processo de germinação e dormência de sementes. Clima (temperatura, precipitação, luminosidade) e características físicas do solo (granulometria, topografia) determinam a zona microclimática da semente. O microclima controla a dormência e germinação da semente. Atributos físicos da semente (permeabilidade do tegumento, tamanho) podem mitigar o efeito microclimático. O estado fisiológico da semente, incluindo herança genética e maternal, pode influenciar o nível de dormência da semente. Fatores biológicos, como patógenos, insetos e fitotoxinas também podem atuar no processo de germinação. Imagem retirada de Bewley et al. (2013).

Aleloquímicos são, portanto, substâncias fitotóxicas, que causam toxidez em plantas, e são provenientes do metabolismo secundário de vegetais, fungos e microrganismos, consistindo, principalmente, de terpenos, derivados fenólicos, flavonoides e alcaloides (Macías et al., 2003; Macías et al., 2007; Reigosa et al., 2013). Estas substâncias podem chegar ao ambiente de diferentes formas: lixiviadas da parte aérea de plantas, liberadas durante a decomposição de serapilheira acumulada no solo, exsudadas de raízes, ou, ainda, volatilizadas pela emissão de partes vivas ou em decomposição (Weir et al., 2004; Lotina-Hennsen et al., 2006; Albuquerque et al., 2010).

Em particular, a emissão de voláteis desempenha diversos papéis ecofisiológicos na natureza, permitindo, inclusive, a comunicação entre plantas e plantas-animais (Pinto-Zevallos et al., 2013). Determinadas substâncias voláteis, como isoprenoides, protegem as plantas de agentes abióticos como a oxidação e as altas temperaturas ao neutralizar espécies reativas de oxigênio reagindo com o ozônio da atmosfera (Loreto et al., 2001; Copolovici et al., 2005). Outras, podem proteger as plantas de micro-organismos, repelir insetos, atrair inimigos naturais, polinizadores ou animais que dispersam sementes (Pichersky and Gershenzon, 2002; McCallum et al., 2011; Huang et al., 2012; McCormick et al., 2012).

Dentre misturas complexas de voláteis e semi-voláteis com importante atuação na ecologia de plantas, destacam-se os óleos essenciais. Tratam-se de complexas misturas de natureza lipídica, com 20 a 60 compostos de baixo peso molecular, constituídas principalmente de terpenos e seus derivados, ainda que seja frequente a presença de outras classes químicas em minoria na composição, como fenilpropanoides, cetonas, hidrocarbonos e ésteres de baixo peso molecular (Biswas et al., 2009; Stolarska and Wieczorek, 2015). Possuem ampla distribuição no reino vegetal, não se restringindo a determinados grupos taxonômicos (Sangwan, 2001), e são frequentemente sintetizadas e armazenadas em tricomas glandulares de partes vegetativas (Pichersky and Gershenzon, 2002), ou também em cavidades foliares e células florais (Maffei et al., 2011; Padovan et al., 2014).

Tradicionalmente, a função de óleos essenciais tem sido investigada como importante agente deterrente, evitando herbivoria de insetos, ou na interação planta-animais, atraindo polinizadores e dispersores de sementes (Pichersky and Gershenzon, 2002; Andrew et al., 2007; Huang et al., 2012). Contudo, recentes estudos têm investigado o papel destes voláteis como agentes de toxidez, influenciando o estabelecimento de populações simpátricas, inclusive com potencial alelopático sobre a germinação de sementes (Azirak and Karaman,

2008; Schmidt-Silva et al., 2011; Pawlowski et al., 2012; Pawlowski et al., 2013; Lazarotto et al. 2014; Rolli et al., 2014; Linhart et al., 2015; Stolarska and Wieczorek, 2015). Ação citotóxica, fototóxica, mutagênese nuclear e citoplasmática são alguns dos efeitos biológicos já registrados em diversos estudos (Tworkoski, 2002; Bakkali et al. 2008; De-Almeida et al., 2010; Stolarska and Wieczorek, 2015).

Baccharis psiadioides (Less.) Joch. Mull. (Asteraceae: Asterae) é um arbusto perene nativo no sul do Brasil e no Uruguai, popularmente conhecido como alecrim-do-campo ou vassoura. Ocorre em formações secundárias de campos, normalmente formando populações densas e dominantes (Setubal and Boldrini, 2010). Este padrão de estabelecimento tem sido atribuído ao potencial alelopático da espécie ao inibir espécies simpátricas por meio de compostos fitotóxicos (Silva et al., 2015). O óleo essencial de *B. psiadioides* já foi caracterizado (Suyenaga et al., 2004; Schimidt-Silva, 2012; Lazarotto et al., 2017), e os compostos têm demonstrado forte atividade fitotóxica sobre divisão celular (Schmidt-Silva et al. 2011), germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas (Silva et al. 2014; Lazarotto et al. 2014; Lazarotto et al., 2017).

Alguns estudos que têm avaliado a influência de aleloquímicos na germinação de sementes tem notado que a sensibilidade dos diásporos às fitotoxinas varia entre diferentes espécies, e que esta sensibilidade pode ser associada às características das sementes, como fatores intrínsecos. Primeiramente, Putnam and DeFrank (1983) verificaram, em experimentos de campo, que resíduos de plantios de cevada (*Hordeum vulgare* L.), aveia (*Avena sativa* L.), centeio (*Secale cereale* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L.) suprimiram a germinação e o crescimento de culturas vegetais com sementes pequenas (p. ex., radite, *Raphanus sativus* L., alface, *Lactuca sativa* L.) e ervas ruderais (p. ex., *Digitaria ischaemum* Schreb ex Muhl., *Portulaca oleraceae* L.), enquanto culturas de sementes grandes (feijão, *Phaseolus vulgaris* L., ervilha, *Pisum sativum* L.) não foram afetadas pelos resíduos. Posteriormente, Burgos and Talbert (2000) reportaram que a inibição do crescimento de caules e raízes foi maior em espécies de sementes pequenas do que em espécies de sementes grandes quando extratos aquosos de cevada foi aplicado sobre as sementes de seis espécies comerciais e nove ervas daninhas em papel-filtro e placas de Petri.

Similarmente, Petersen et al. (2001) verificaram que a sensibilidade de seis ervas daninhas aos isotiocianatos liberados por variedades de nabo (*Brassica rapa* L.), em extrato aquoso, dependeu do tamanho das sementes das espécies, sendo as menores sementes mais

sensíveis ao efeito fitotóxico. Liebman and Sundberg (2006) também utilizou extratos aquosos com compostos fenólicos fitotóxicos de trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.) em bioensaios para germinação de 62 acessos distintos de sementes que variavam em sua massa; neste estudo, os autores verificaram uma correlação negativa entre a suscetibilidade das sementes ao fitotóxico e sua massa. Da mesma maneira, Williams and Bartholomew (2011; 2012) verificaram que a variação da sensibilidade de sementes de diferentes massas de rabanete (*Raphanus sativus* L.) e ervilhaca-vilosa (*Vicia villosa* Roth.) na germinação sob ação de cumarina em extratos aquosos foi diferente, sendo as sementes pequenas mais sensíveis.

Além dos estudos específicos que buscam compreender a relação da ação de fitotóxicos sobre a germinação de sementes de diferentes tamanhos, outros estudos investigam a influência de variados estresses sobre diásporos, relacionando com seus respectivos tamanhos. Jensen and Gutekunst (2003) verificaram que o tamanho das sementes pode estar relacionado com as respostas da germinação e estabelecimento de plântulas de campo ao efeito de camadas de serrapilheira. Hanley et al. (2007) investigou a resposta de sementes de diferentes tamanhos sob carência de determinados nutrientes como nitrogênio, fósforo, potássio e combinações dentre estes. Além do mais, diversos autores têm apontado uma clara evidência adaptativa entre o tamanho da semente e a dependência de fotoblastismo para germinação (Milberg et al., 2000; Rojas-Arechiga et al., 2013).

De fato, o tamanho da semente pode afetar muitos aspectos relacionados à ecologia das plantas. Espécies com sementes menores produzem mais sementes que espécies com sementes maiores para um mesmo gasto de energia, enquanto espécies com sementes maiores desenvolvem plântulas capazes de tolerar melhor as adversidades encontradas durante o estabelecimento inicial (Leishman et al., 2000; Henery and Westoby, 2001; Aarssen and Jordan, 2001). Neste sentido, existem diversas hipóteses e estudos que discutem a relação do tamanho da semente com o hábito e habitat das espécies, tipos de dispersão, ciclos de vida e características de estabelecimento (Silvertown, 1989; Leishman and Westoby, 1994a; Leishman et al., 2000; Levin and Muller-Landau, 2000; Moles et al., 2005; Hanley et al., 2007; Eriksson, 2008).

Neste sentido, um melhor entendimento sobre como a influência de fatores bióticos pode estar relacionados à ecologia de sementes é necessário para apropriadas generalizações e potenciais aplicações deste conhecimento. Especificamente, o efeito de óleos essenciais em sementes de diferentes tamanhos ainda não foi testado, de forma que existe uma lacuna de

conhecimento se o padrão de maior suscetibilidade de sementes pequenas também se aplica à fitotoxinas derivadas de terpenos. Para contribuir com esta lacuna, a suscetibilidade na germinação de 21 acessos de sementes, variando em seu tamanho, a um óleo essencial fitotóxico é apresentada neste trabalho. Para verificar se sementes maiores são mais tolerantes ao óleo fitotóxico, o nível de inibição de cada acesso foi calculado e relacionado com os tamanhos de sementes abrangidos no estudo.

1.1 Objetivo da dissertação

Esta dissertação teve como objetivo verificar se o grau de sensibilidade de sementes a um óleo essencial fitotóxico pode estar relacionado com as características físicas dos diásporos em si, especialmente, sua massa e tamanho. Para isso, foi realizado um estudo em laboratório no qual 21 diásporos, distribuídos entre diferentes graus de grandeza, foram submetidos a curvas de dose-resposta para determinar a dosagem de óleo essencial capaz de inibir a germinação de 50% (ED_{50}) do número de sementes em comparação com o controle. Os valores de ED_{50} calculados foram relacionados com os tamanhos das sementes dos acessos utilizados no estudo. Este estudo é apresentado em forma de artigo científico no capítulo seguinte desta dissertação. Ao fim, são apresentadas considerações finais, e também sugestões para futuros estudos sobre o tema.

2 CAPÍTULO I

Seed size is correlated with susceptibility to phytotoxic effects of an essential oil during germination¹

M. Köhler* and G.L.G. Soares

Programa de Pós-Graduação em Botânica, Laboratório de Ecologia Química e Quimiotaxonomia (LEQTAX), Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Abstract

Seed size is an important functional trait in plant ecology with real implications on germination. Here, we aimed to verify how this attribute may be related to susceptibility to a phytotoxic essential oil during germination. Twenty one accessions, spanning six botanical families and four orders of magnitude in seed mass, were submitted to a battery of dose-response experiments to determine the sensitivity of each accession. Essential oil from *Baccharis psiadioides* (Less.) Joch. Mull. (Asteraceae) was used as phytotoxin. Germination inhibition was calculated with the effective dose (ED₅₀) which corresponds to the dosage of essential oil capable of inhibiting the germination from 50% of the sample compared to the control of each accession. Results showed a positive correlation between seed size and ED₅₀. Smaller seeds needed lower quantities of essential oil to inhibit germination whereas larger seeds needed more than twice essential oil. This pattern has been reported for aqueous extract with isoflavonoids, phenolic acid derivatives, isothiocyanates, coumarins and now are observed for essential oil derived from terpenoid pathway. Seed size is related with the amount of the nutrient reserve provided for the embryo by the mother plant. Therefore, small-seeded species generally have fewer reserves with which to support growing embryo and seedling respiration during periods of stress-induced. Furthermore, small seeds have greater amounts of root length per unit of root mass, providing greater absorptive surface area through which phytotoxins might enter and cause subsequent damages. Effects reported herein may be a pattern for action of other essential oils, however, others studies may be conducted relating other seed attributes as seed reserve or embryo size.

Key-words: *Baccharis psiadioides*; crop seeds; dose-response analysis; germination inhibition; terpenes; seed mass.

¹ Artigo elaborado para submissão ao periódico "Seed Science Research" (ISSN 0960-2585).

* Correspondence

Email: matias.k@ufrgs.br

2.1 Introduction

Seed size, also comprised as seed mass in literature, is an important functional trait in plant ecology which has been investigated by different ways since the last century (Salisbury, 1974; Silvertown, 1989; Leishman et al., 2000; Milberg et al., 2000; Moles et al., 2005a; Eriksson, 2008; Linkies et al., 2010). As lineages evolve and speciate, angiosperms moved out of the tropics and shifted from being predominantly small-seeded to having a much wider range of seed sizes, being that extant angiosperms have seed masses spanning over 11 orders of magnitude, from the dust seeds of orchids up to the 20 kg seeds of the double coconut (Harper, 1970; Eriksson et al., 2000; Moles 2005a, 2005b).

Small-seeded species are able to produce more seeds for a given quantity of maternal reproductive effort than are large-seeded species (Henery and Westoby, 2001; Leishman et al., 2000; Moles et al., 2005). Also, smaller seeds are incorporated into the soil seed bank and dispersed more easily, increasing persistence and decreasing depredation (Funes et al. 1999; Leishman et al., 2000; Moles and Westoby, 2004). Alternatively, there is a variety of experimental evidence that larger seeds are better able to tolerate many of the stresses confronted when seedling establishment starts such as competition, shading, mineral nutrient shortage, defoliation and being covered by deeper soil or by litter (see Leishman et al., 1995, Leishman et al., 2001 and references therein). Furthermore, within same species, it is common for the larger seed to have better seed quality and more vigorous seedlings than smaller seed (Kneebone and Cremer, 1955; Cideciyan et al., 1982; Milberg et al., 1996)

A huge range of biotic and abiotic factors can influence germination (Arditti, 1967; Bewley and Black, 1982; Bewley et al. 2013;), being temperature, light, water and salinity the most explored abiotic factors in science literature (Bewley et al., 2013; Fernando et al., 2016; Wang et al., 2016). Biotic factors are usually less reported, although have been investigated especially by allelopathy bias (Macías et al., 2007; Reigosa et al., 1999, 2006; Scognamiglio et al., 2013), wherein effects of chemical compounds released into the environment by living organisms are studied. Particularly, effects of volatile essential oils from plants are recently being focused as an important biotic factor that can affect seed germination (Tworkoski, 2002; Azirak and Karaman, 2008; Linhart et al., 2014; Pawlowski et al., 2012, 2013; Schmidt-Silva et al., 2011; Silva et al., 2014). These factors deserve special attention due to its relevance in seed plant ecology and its potential implications for weed management in agroecosystems (Dayan and Duke, 2010).

In these sense, some studies have shown that small seeds are more sensitive than large seeds when phytotoxins interact in germination (Liebman and Sundberg, 2006; Petersen et al., 2001; Williams and Bartholomew, 2011, 2012). However, these studies have tested the effects of few compounds, specially aqueous extracts with isoflavonoids, phenolic acid derivatives, isothiocyanates and coumarins, even without osmotic and pH controls. In addition, these studies did not contemplate or corroborate the observed action for volatiles terpenes, which have a distinct way of action when compared to aqueous extracts, because of their partial solubility in water and have a specific mechanism of penetration (Weidenhamer, et al., 1993; Fichan et al., 1999; Azirak and Karaman, 2008).

Baccharis psiadioides (Less.) Joch. Mull. (Asteraceae) is a shrub that grows in grasslands and shrublands in Uruguay and South of Brazil, often forming dense and dominant populations (Setubal and Boldrini, 2010). This pattern of establishment may indicate that the species may release phytotoxic compounds into the environment inhibiting sympatric species through allelopathy (Silva et al., 2015). The species produces large amounts volatile compounds, which is easily noticeable in the field by the strong scent of the volatile substances. Essential oil of *B. psiadioides* have already been characterized (Suyenaga et al., 2004; Lazarotto et al., 2017), and the compounds have already shown strong phytotoxic effects on cell division (Schmidt-Silva et al. 2011), seed germination and early growth (Silva et al. 2014; Lazarotto et al. 2014; Lazarotto et al., 2017).

Therefore, a better understanding of how seed size may be related with biotic factors that affect germination is needed to an appropriate knowledge that allows broad generalizations. To contribute with this matter, a different sensitivity of 21 seeds accession to a phytotoxic essential oil on germination was evaluated. In addition, to check if larger seeds are more tolerant than smaller ones, inhibition level of each accession were related to spanning seed mass and other attributes.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Seeds

Seeds were obtained from commercial seed dealers, other research groups, and our own field collections (Table S1 in Supplementary Material for origin details). We choose crop

species, without any degree of dormancy, and with homogeneous germination to minimize other factors that may not be related to seed size. For some species more than one cultivar were obtained. Thus, we refer to each species or cultivar as an accession. Asteraceae and Poaceae accessions refer to their fruits (cypsela and caryopsis, respectively) but for conciseness, these are treated as seeds here.

To determine the mean seed mass of each accession, three samples of 100 seeds were dried at 105 °C for 24 h and then weighed (a hundred seed mass - HSM). The average of the three dried samples was used for data analysis. Percent moisture was calculated by $\{[(\text{fresh weight} - \text{dry weight})/\text{fresh weight}] \times 100\}$. Seeds from the same sources that were not subjected to high-temperature drying were used in the subsequent experiments.

2.2.2 *Plant material and essential oil*

Leaves of *Baccharis psiadioides* (Less.) Joch. Mull. (Asteraceae: Asterae) were collected in natural populations at Morro Santana (30°03'S, 51°07'W), a hill in the city of Porto Alegre (Rio Grande do Sul State, Brazil), between September and October 2015. A voucher specimen was deposited in the Herbarium ICN of the Federal University of Rio Grande do Sul (ICN 175007).

The collected material was dried at room temperature for two weeks. Then, essential oil was obtained from the leaves by steam distillation carried out with 6 kg of dry leaves using an inox extractor with a steam flow rate of 3 L/h for 1 hour, yielding 0,46% (w/v). Anhydrous sodium sulfate was employed to remove residual water from essential oil samples. Essential oil was stored in glass vials (5mL), wrapped in aluminum foil and stored in ultra freezer (− 80 °C) prior to use.

2.2.3 *Bioassays*

To determine the sensitivity level of each accession to phytotoxic essential oil, we submitted each accession to dose-response experiments. The dose-response experiments consisted in eight to ten treatments and four replicates of each treatment per accession, in a completely random design. The essential oil doses in treatments varied from zero (control) to 150 μL of pure essential oil, being the range of doses for each accession explored in pilot tests.

Thirty seeds were used in each replicate. Accessions with HSM less than 2,000 mg (small seeds) were conducted in glass Petri dishes (10 cm x 1.5 cm); and accessions with HSM more than 2,000 mg (large seeds) were conducted in germination boxes (gerbox) with a glass cover (11 cm x 11 cm x 3.5 cm). Seeds were placed on one layer of quantitative filter paper (80g) with 7 mL of distilled water into petri dishes and 10 mL into germination boxes. This distinction was necessary because the larger seeds did not germinate in the petri dishes maintaining the number of thirty seeds per recipient and the air saturation of the recipients.

Essential oil was dropped onto a cotton ball attached with double-sided tape to the inner face of the container lid (gerbox or Petri dishes) without direct contact between seeds and water, but allowing the compounds to volatilize into the airspace within the box. Control treatments did not receive oil. The gerboxes and petri dishes were sealed with plastic film to minimize loss of the volatiles, and were incubated in a germination room at an average temperature of 22 °C (+/- 2°C), with long-day photoperiod (>12 hour of light). The illumination was provided by white fluorescent lamps (20W), with an irradiance of 48 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$.

The seeds were kept in the germination chamber for three weeks. The number of germinated seeds in each replicate was counted on the first, third and last day of the experiment. Seeds were considered germinated when they had a radicle larger than 2 mm. Control of each accession usually reached the highest germination rate in the first 5-7 days, but all treatments were maintained until end of experiment to certify the inhibition of germination. Experiments were conducted between January and December 2016.

2.2.4 Data analysis

Each accession had its germination inhibition level by the essential oil calculated with the mean effective dose (ED_{50}), which corresponds to that dosage of essential oil capable of inhibiting the germination of 50% of the population compared to the control of each accession in the same conditions. The ED_{50} was calculated by a nonlinear regression using open-source statistical environment R (R Core Team, 2017), with the add-on package *drc*, and three-parametric log-logistic model as proposed by Ritz and Streibig (2005) and Ritz et al. (2015).

The ED_{50} were subjected to analysis of covariance using the \log_e -transformed mean 100-seed mass (HSM – in milligrams) of each accession as a quantitative explanatory factor. \log_e -transformation was necessary to meet normality requirements for generalized linear model. We also compared the ED_{50} average of smaller and larger accession between groups by univariate analysis of variance with randomization (PERMANOVA) with 10,000 bootstrap iterations, used Euclidean distance as dissimilarity measure. Correlations and regressions between ED_{50} and HSM were performed using the software InfoStat (2012) and PERMANOVA was performed using the software MULTIV (Pillar, 2009).

2.3 Results and Discussion

Accessions varied their seeds size (mass) in four orders of magnitude, from 8.4 mg to 32,781.5 mg, with median 1,556.7 mg, spanning six angiosperm botanical families: Asteraceae, Brassicaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Pedaliaceae and Poaceae. The accessions also differed in their germination susceptibilities to phytotoxic essential oil, with ED_{50} varying from 15.86 μ L to 114.9 μ L (Table 1). This difference was corroborated by significant difference between mean ED_{50} from smaller and larger seeds groups (Fig. 1).

Correlation was detected between ED_{50} and HSM ($r = 0.85$, $P < 0.001$) (Fig. 2), indicating that smaller seeds were more sensitive to phytotoxic effects of essential oil in germination than larger seeds. Larger seeds required higher essential oil dosage to inhibit their germination. For example, *Triticum* and *Zea* accessions had to receive around 60 μ L and 112 μ L, respectively, whereas *Origanum* and *Matricaria* had to receive around 19 μ L to inhibit germination from 50 % of seeds samples compared with each accession control treatments. No correlation between seed moisture and phytotoxicity susceptibility was observed.

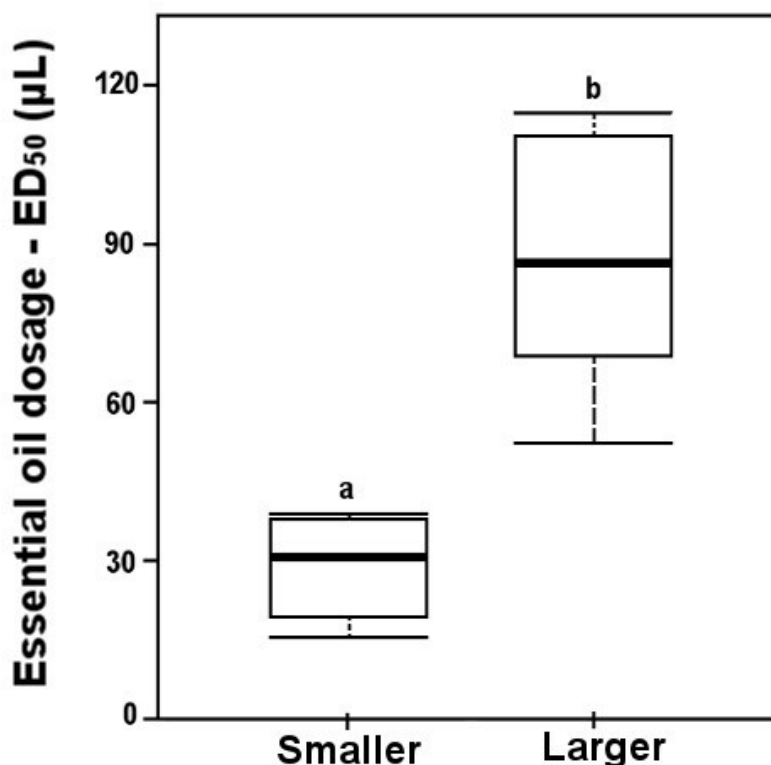


Fig. 1: Mean ED₅₀ from smaller and larger seeds groups in box plot with upper and lower limits from each group. Groups differed significantly according to PERMANOVA with randomization at $p < 0.001$ level.

Three accessions caught attention to its limit border using the adjusted regression model: in the lower limits, *Sesamun indicum* L. (*Si*) and *Raphanus sativus* L. (*Rs*) had an ED₅₀ under the expected as function to their seed mass; alternatively, *Helianthus annuus* L. (*Ha*) had an ED₅₀ almost above the limits margin of the predictive equation (Fig. 2). These cases may be related to other seed attributes: differences in seed reserves might contribute to variation among species in their ability to mobilize reserves, respond to temperature and also to detoxify phytotoxins (Bewley and Black, 1994; González-Beloe et al., 2014). The three accessions are widely recognized as oleaginous seeds (Pérez-Vich et al., 1998; Carvalho et al., 2012; Chammoun et al., 2013) and lipid content of seeds may have a specific lipophilic interaction with essential oil, although this hypothesis still has to be investigated with an appropriate experimental design.

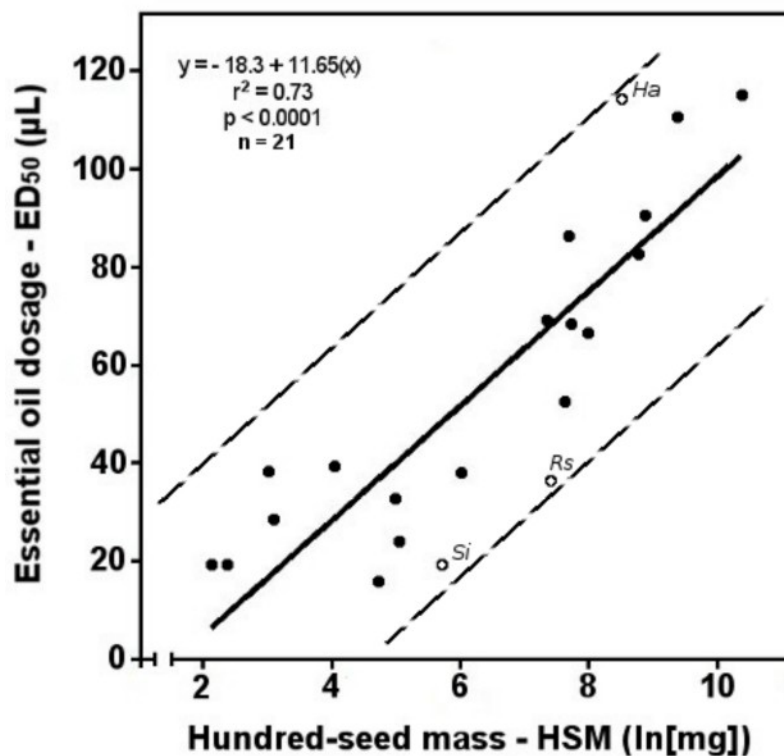


Fig. 2: Effective essential oil dosage (ED_{50}) of each accession as a function of seed mass. Twenty one accessions differing in their seed size were exposed to a dose-response experiment to determine essential oil dose capable inhibit germination of 50 % of population compare to each control treatment. The dashed lines represent an approximate 95% confidence interval of the regression as a function of the proposed model. See text for methods of bioassays, calculating ED_{50} and data analysis.

n=21

Between accessions from the same species that varied in cultivars, slightly difference in ED_{50} was checked: larger cultivar *Zea mays* 'IAC 8390' needed up to 114.9 µL whereas smaller cultivar 'IAC 125 Pipoca' needed 110.5 µL; heaviest *Triticum aestivum* cultivar 'TBIO Parrudo' had 66.5 µL whereas lighter 'TBIO Sossego' had 52.3 µL. This pattern of seed size variation within same species have been explored by Williams and Bartholomew (2011, 2012). These authors used a mixed seed size population to separate a large population of seeds from two single species (*Vicia villosa* Roth. and *Raphanus sativus* L.) into three size classes (large, medium and small). This allows the analysis of the effects of a given

phytotoxin directly as a function of seed size, and confirmed, with appropriate statistically, that smaller seeds are more sensitive to a phytotoxic aqueous extract of coumarin in germination response to coumarin at 10^{-3} and 10^{-5} .

Results presented here are consistent with reports from other researchers working with non-essential oil phytotoxins and target species representing a range of seed masses. Firstly, Putnam and DeFrank (1983) checked, in field experiments, that cover crop residues of barley (*Hordeum vulgare* L.), oat (*Avena sativa* L.), rye (*Secale cereale* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L.) suppressed the germination and growth of smaller-seeded vegetables (e.g., radish, *R. sativus*, lettuce, *Lactuca sativa* L.) and weeds (e.g., smooth crabgrass, *Digitaria ischaemum* Schreb ex Muhl., pigweed, *Portulaca oleraceae* L.), whereas the residues had no effect on the growth of larger-seeded vegetables (bean, *Phaseolus vulgaris* L., pea, *Pisum sativum* L.). Posteriorly, Burgos and Talbert (2000) found that inhibition of root and shoot growth was greater for small-seeded species than for larger-seeded species when aqueous extracts of rye were applied to seeds of six crop and nine weed species in filter paper and petri dishes. Likewise, Petersen (2001) used five weed species and wheat seeds placed in filter paper and petri dishes exposed to methanol-water solutions containing isothiocyanates released by turnip–rape mulch (*Brassica napus* L.) and observed a negative correlation between seed mass and germination percentage, with smaller seeds being more inhibited than larger seeds. Finally, Liebman and Sundberg (2006) contemplated a large group of weed and crop species (62 in total) spanning three orders of magnitude in mass. They quantified relationships between seed size and susceptibility to phytotoxins derived from aqueous extracts of red clover shoots (*Trifolium pratense* L.) in laboratory bioassays using filter paper and petri dishes. Greater germination and radicle inhibition for lighter seeds and least for heavier seeds were found. Additionally, a greater radicle inhibition for monocotyledonous than dicotyledonous species when seed size was held constant statistically was observed.

Small-seeded species may present greater susceptibility to phytotoxins than large-seeded species for reasons that have been discussed within seed ecology. For example, seed size is related to the amount of nutrient reserve provided for embryo by mother plant. Thus, small-seeded species generally have fewer reserves with which to support growing embryo and seedling respiration during periods of stress-induced by carbon deficit, suffering reductions in early embryo growth (Leishman and Westoby, 1994; Westoby et al., 2002;

Liebman and Sundberg, 2006). Furthermore, small-seeded species have longer roots per unit of root mass (Seiber and Pearce, 1993), providing higher absorptive surface area through which phytotoxins might enter and cause subsequent damages. However, ecology implications still have to be discussed. Moles and Westoby (2004) explored relationships between seed mass, tolerance of various forms of stress (nutrient deficits, drought, burial, shading, defoliation and resource competition), and fecundity, and concluded that the stress-tolerance disadvantage of smaller-seeded species might be offset by their ability to produce more seeds. Therefore, small-seeded species, which were highly susceptible to phytotoxins in the present study, might persist abundantly in an ecological system with released phytotoxins unless their survival and fecundity were greatly diminished.

Table 1. Seed species used in bioassays with respective botanical family, hundred seed mass (mg), moisture content and ED₅₀ calculated.

Species	100-seed mass 'HSM' (mg)	% H ₂ O	ED ₅₀ (μL)
Asteraceae			
<i>Helianthus annuus</i> L. 'Multissol'	5043.5	5.93	114.08
<i>Matricaria recutita</i> L.	10.7	20.74	19.16
Brassicaceae			
<i>Brassica oleracea</i> L. 'Bortytis'	418.3	6.94	38.49
<i>Eruca sativa</i> Mill.	147.9	6.21	32.78
<i>Nasturtium officinale</i> R.Br.	20.4	9.13	38.21
<i>Raphanus sativus</i> L. 'Acanthiformis'	1637.9	4.40	36.46
Fabaceae			
<i>Cajanus cajans</i> (L.) Millsp) 'IAPAR 43'	6540.1	10.53	82.45
<i>Crotalaria spectabilis</i> Roth	1556.7	9.30	69.20
<i>Lens culinaris</i> Medik.	7167.6	16.72	90.44
<i>Lotus corniculatus</i> L.	114.6	11.14	15.86
<i>Trifolium repens</i> L.	57.25	7.47	39.25
Lamiaceae			
<i>Origanum vulgare</i> L.	8.4	7.18	19.18
Pedaliaceae			
<i>Sesamun indicum</i> L. 'IAC Ouro'	301.4	4.48	19.26
Poaceae			
<i>Eragrostis plana</i> Nees	22.05	8.79	28.55
<i>Oryza sativa</i> L. 'IAC 500'	2205.4	10.38	86.19
<i>Oryza sativa</i> L. 'BRS Nipon'	2299.5	9.86	68.32
<i>Paspalum notatum</i> Flügge	156.2	10.94	24.02
<i>Triticum aestivum</i> L. 'TBIO Parrudo'	2975.8	10.91	66.58
<i>Triticum aestivum</i> L. 'TBIO Sossego'	2075.4	10.80	52.39
<i>Zea mays</i> L. 'IAC 125 Pipoca'	11830.5	9.89	110.50
<i>Zea mays</i> L. 'IAC 8390'	32781.5	10.17	114.90

Essential oil of *B. psiadioides* have already been characterized (Suyenaga et al., 2004; Schmidt-Silva, 2012; Lazarotto et al., 2017), and differences in the oil composition have been reported. The main constituents have been identified as monoterpenes hydrocarbons, followed by sesquiterpenes hydrocarbons, oxygenated monoterpenes and oxygenated sesquiterpenes, with monoterpene β -pinene the major compound of the oil (Schmidt-Silva, 2012; Lazarotto et al., 2017); whereas Suyenaga et al. (2004) characterized

the oil specially by sesquiterpenes hydrocarbons, being the major compound the germacrene D, and without oxygenated monoterpenes identified. Although no attempt was made in the present study to isolate or to characterize the chemical agents present in *B. psiadioides* essential oil, previous investigations lead us to believe that observed effects may be caused by synergistic activity exerted by the compounds present in the essential oil and not just by its majority compounds (Schmidt-Silva et al., 2011).

Mode of action of phytotoxins derived from terpenoid pathway is not fully understood, and because of the great number of constituents, essential oils seem to have no specific cellular targets (Bakkali et al., 2008). Mono and sesquiterpenes are known to reduce mitotic activity of root cells - apparently by impede cell nuclear and organellar DNA synthesis -, to inhibit mitochondrial respiration of isolated organelles, to increase reactive oxygen species production and to disrupt cell membranes (Lorber and Muller, 1980; Nishida et al., 2005; Bakkali et al., 2008; Stolarska and Wieczorek, 2015). Mitotic activity depression and chromosomal abnormalities in root meristematic cells has been reported previously for *B. psiadioides* essential oil in onion and lettuce seedlings (Schmidt-Silva et al., 2011). Furthermore, oxidative damage with H₂O₂ accumulation has been recorded by Lazarotto et al. (2014) and was related with depigmentation of cotyledons in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh seedlings. In fact, oxidative molecules can degrade chlorophyll or inhibit its synthesis, and consequently affect photosynthesis (Weir et al., 2004; Aarti et al., 2006). In the present study, cotyledons of seedlings accessions that can germinate became whitish after exposure to the oil, and at the end of bioassays, germinated and non germinated seeds presented a disintegrated structure. Therefore, morphological effects observed can be assigned to the capacity of the oil to cause damages on mitosis, to affect photosynthesis mediated by oxidative damage, and also to disrupt cell membranes.

Effects reported herein may be a pattern for action of other essential oils. Preliminary tests with essential oil from other species have shown the same results: smaller seeds more sensitive to phytotoxic effects (data not shown). However, others studies may be conducted including other seeds - spanning different orders of magnitude or different botanical families - or relating other attributes as seed reserve or embryo size.

2.4 Acknowledgements

We thank Luís H.R. Silveira for technical assistance and Eliane R. Silva for the helpful comments.

2.5 Financial support

MK are grateful to CAPES for his fellowship funding; GLGS are also grateful to CNPq for their productivity grant.

2.6 Conflict of interest

None.

2.7 References

- Aarti, P. D., Tanaka, R. and Tanaka, A.** (2006) Effects of oxidative stress on chlorophyll biosynthesis in cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons. *Physiologia Plantarum*, 128(1), 186–197.
- Arditti, J.** (1967) Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*, Vol. 33, n. 1, 1-97p.
- Azirak, S. and Karaman, S.** (2008) Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 58(1), 88–92.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M.** (2008) Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.
- Bewley, J. D. and Black, M.** (1982) *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*. Berlin: Springer-Verlag.
- Bewley, J.D. and Black, M.** (1994) *Seeds: Physiology of Development and Germination*. New York: Plenum Press.
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M. and Nonogaki, H.** (2013) *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*. New York, Springer.
- Burgos, N. R. and Talbert, R. E.** (2000) Differential activity of allelochemicals from *Secale cereale* in seedling bioassays. *Weed Science*, 48(3), 302–310.
- Carvalho, R. H. R., Galvão, E. L., Barros, J. A. C., Conceição, M. M. and Sousa, E.** (2012) Extraction, fatty acid profile and antioxidant activity of sesame extract (*Sesamum Indicum* L.). *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29(2), 409–420.
- Chammoun, N., Geller, D. P. and Das, K. C.** (2013) Fuel properties, performance testing and economic feasibility of *Raphanus sativus* (oilseed radish) biodiesel. *Industrial Crops and Products*, 45, 155–159.
- Cideciyan, M. A. and Malloch, A. J.** (1982) Effects of seed size on the germination, growth and competitive ability of *Rumex crispus* and *Rumex obtusifolius*. *The Journal of Ecology*, 227–232.

- Dayan, F. E., and Duke, S.O.** (2010) Natural products for weed management in organic farming in the USA. *Outlooks on Pest Management* 21:156–160.
- Eriksson, O.** (2008) Evolution of seed size and biotic seed dispersal in angiosperms: paleoecological and neoecological evidence. *International Journal of Plant Sciences*, 169(7), 863–870.
- Eriksson, O., Friis, E. M., Pedersen, K. R., and Crane, P. R.** (2000) Seed size and dispersal systems of Early Cretaceous angiosperms from Famalicao, Portugal. *International Journal of Plant Sciences*, 161(2), 319–329.
- Fernando, N., Humphries, T., Florentine, S. K. and Chauhan, B. S.** (2016) Factors Affecting Seed Germination of Feather Fingergrass (*Chloris virgata*). *Weed Science*, 64(4), 605–612.
- Fichan, I., Larroche, C. and Gros, J. B.** (1999) Water solubility, vapor pressure, and activity coefficients of terpenes and terpenoids. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 44(1), 56–62.
- Funes, G., Basconcelo, S., Díaz, S., and Cabido, M.** (1999) Seed size and shape are good predictors of seed persistence in soil in temperate mountain grasslands of Argentina. *Seed Science Research*, 9(04), 341–345.
- González-Belo, R., Tognetti, J., Benech-Arnold, R. and Izquierdo, N. G.** (2014) Germination responses to temperature and water potential as affected by seed oil composition in sunflower. *Industrial Crops and Products*, 62, 537–544.
- Harper, J. L., Lovell, P. H., and Moore, K. G.** (1970) The shapes and sizes of seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1(1), 327–356.
- Henery, M. L., and Westoby, M.** (2001) Seed mass and seed nutrient content as predictors of seed output variation between species. *Oikos*, 92(3), 479–490.
- InfoStat** (2012) *Software estadístico*. Córdoba, Argentina: UNC. Available from <http://www.infostat.com.ar/>
- Kneebone, W. R. and Cremer, C. L.** (1955) The relationship of seed size to seedling vigor in some native grass species. *Agronomy Journal*, 47(10), 472–477.
- Lazarotto, D. C., da Silva, E. R., Pawlowski, Â., Ricachenevsky, F. K., Zini, C. A. and Soares, G. L. G.** (2017) Phytotoxic effects of *Baccharis psiadioides* (Asteraceae) volatiles on different phases of plant development. *Journal of Essential Oil Research*, 1–7.
- Lazarotto, D. C., Pawlowski, Â., da Silva, E. R., Schwambach, J. and Soares, G. L. G.** (2014) Phytotoxic effects of *Heterothalamus psiadioides* (Asteraceae) essential oil on adventitious rooting. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(12), 3163–3171.
- Leishman, M. R.** (2001) Does the seed size/number trade-off model determine plant community structure? an assessment of the model mechanisms and their generality. *Oikos*, 93(2), 294–302.
- Leishman, M. R., Westoby, M. and Jurado, E.** (1995) Correlates of seed size variation: a comparison among five temperate floras. *Journal of Ecology*, 517–529.
- Leishman, M. R., Wright, I. J., Moles, A. T. and Westoby, M.** (2000) The evolutionary ecology of seed size., pp. 31–57 in Fenner, M. (Ed.) *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Leishman, M.R. and Westoby, M.** (1994) Hypotheses on seed size - Tests using the semiarid Flora of Western New-South-Wales, Australia. *American Naturalist*. 143, 890-906.
- Liebman, M. and Sundberg, D. N.** (2006) Seed mass affects the susceptibility of weed and crop species to phytotoxins extracted from red clover shoots. *Weed Science*, 54(2), 340–345.
- Linhart, Y. B., Gauthier, P., Keefover-Ring, K. and Thompson, J. D.** (2014) Variable phytotoxic effects of *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) terpenes on associated species. *International Journal of Plant Sciences*, 176(1), 20–30.
- Linkies, A., Graeber, K., Knight, C., and Leubner-Metzger, G.** (2010) The evolution of seeds. *New*

- Phytologist*, 186(4), 817–831.
- Lorber, P. and Muller, W. H.** (1980) Volatile growth inhibitors produced by *Salvia leucophylla*: effects on metabolic activity in mitochondrial suspensions. *Comparative Physiology and Ecology*, 5, 68–75.
- Macías, F. A., Molinillo, J. M., Varela, R. M. and Galindo, J. C.** (2007) Allelopathy—a natural alternative for weed control. *Pest Management Science*, 63(4), 327–348.
- Milberg, P., Andersson, L., and Thompson, K.** (2000) Large-seeded spices are less dependent on light for germination than small-seeded ones. *Seed Science Research*, 10(01), 99–104.
- Milberg, P., Andersson, L., Elfverson, C. and Regner, S.** (1996) Germination characteristics of seeds differing in mass. *Seed Science Research*, 6(04), 191–198.
- Moles, A. T. and Westoby, M.** (2004) Seedling survival and seed size: a synthesis of the literature. *Journal of Ecology*, 92(3), 372–383.
- Moles, A. T., Ackerly, D. D., Webb, C. O., Tweddle, J. C., Dickie, J. B. and Westoby, M.** (2005a) A brief history of seed size. *Science*, 307(5709), 576–580.
- Moles, A. T., Ackerly, D. D., Webb, C. O., Tweddle, J. C., Dickie, J. B., Pitman, A. J., and Westoby, M.** (2005b) Factors that shape seed mass evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), 10540–10544.
- Moles, A. T., and Westoby, M.** (2004) Seedling survival and seed size: a synthesis of the literature. *Journal of Ecology*, 92(3), 372–383.
- Nishida, N., Tamotsu, S., Nagata, N., Saito, C. and Sakai, A.** (2005) Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, 31(5), 1187–1203.
- Pawlowski, Â., Kaltchuk-Santos, E., Brasil, M. C., Caramão, E. B., Zini, C. A. and Soares, G. L. G.** (2013) Chemical composition of *Schinus lentiscifolius* March. essential oil and its phytotoxic and cytotoxic effects on lettuce and onion. *South African Journal of Botany*, 88, 198–203.
- Pawlowski, Â., Kaltchuk-Santos, E., Zini, C. A., Caramão, E. B. and Soares, G. L. G.** (2012) Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. *South African Journal of Botany*, 80, 96–103.
- Pérez-Vich, B., Velasco, L. and Fernández-Martínez, J. M.** (1998) Determination of seed oil content and fatty acid composition in sunflower through the analysis of intact seeds, husked seeds, meal and oil by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(5), 547–555.
- Petersen, J., Belz, R., Walker, F. and Hurle, K.** (2001) Weed suppression by release of isothiocyanates from turnip-rape mulch. *Agronomy Journal*, 93(1), 37–43.
- Pillar, V.D.** (2009) 'MULTIV, software for multivariate exploratory analysis, randomization testing and bootstrap resampling, version Beta 2.6.8.' (Departamento de Ecologia, UFRGS: Porto Alegre) Available at <http://ecoqua.ecologia.ufrgs.br/MULTIV.html>
- Putnam, A. R. and DeFrank, J.** (1983) Use of phytotoxic plant residues for selective weed control. *Crop Protection*, 2(2), 173–181.
- R Core Team.** (2017) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria; 2017. Available from: <http://www.R-project.org/>
- Reigosa, M. J., Pedrol, N. and González, L.** (2006) *Allelopathy: a physiological process with ecological implications*. Netherlands, Springer.
- Reigosa, M. J., Sánchez-Moreiras, A. and González, L.** (1999) Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(5), 577–608.

- Ritz, C. and Streibig, J. C.** (2005) Bioassay analysis using R. *Journal of Statistical Software*, 12(5), 1–22.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C. and Gerhard, D.** (2015) Dose-response analysis using R. *PloS one*, 10(12), e0146021.
- Salisbury, E.** (1974) Seed size and mass in relation to environment. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 186(1083), 83–88.
- Schmidt-Silva, V.** (2012) *Potencial alelopático do óleo essencial de espécies de Heterothalamus nativas do Rio Grande do Sul*. PhD Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.
- Schmidt-Silva, V., Pawlowski, Â., dos Santos, E. K., Zini, C. A. and Soares, G. L.** (2011) Cytotoxicity of essential oils from two species of Heterothalamus (Asteraceae). *Australian Journal of Botany*, 59(7), 682–691.
- Scognamiglio, M., D’Abrosca, B., Esposito, A., Pacifico, S., Monaco, P. and Fiorentino, A.** (2013) Plant growth inhibitors: allelopathic role or phytotoxic effects? Focus on Mediterranean biomes. *Phytochemistry Reviews*, 12(4), 803–830.
- Seibert, A. C. and Pearce, R. B.** (1993) Growth analysis of weed and crop species with reference to seed weight. *Weed Science*, 41:52–56.
- Setubal, R. B. and Boldrini, I. I.** (2010). Floristic and characterization of grassland vegetation at a granitic hill in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Biociências*, 8(1):85-111.
- Silva, E. R., Ferreira, P. M., Overbeck, G. E. and Soares, G. L.** (2015) Does the phytotoxic shrub *Heterothalamus psidioides* affect a plant community through allelopathy? *Plant Ecology*, 216(1), 87–97.
- Silva, E. R., Overbeck, G. E. and Soares, G. L. G.** (2014) Phytotoxicity of volatiles from fresh and dry leaves of two Asteraceae shrubs: evaluation of seasonal effects. *South African Journal of Botany*, 93, 14–18.
- Silvertown, J.** (1989) The paradox of seed size and adaptation. *Trends in Ecology & Evolution*, 4(1), 24–26.
- Stolarska, A. and Wieczorek, A.** (2015) The effect of some essential oils on adenine nucleotide levels and activity of oxidative stress enzymes in caraway (*Carum carvi* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 27(4), 343–354.
- Suyenaga, E. S., Apel, M. A., Chaves, C. G., Zuanazzi, J. A. and Henriques, A. T.** (2004) Essential oil composition of *Heterothalamus psidioides* Less. *Biochemical systematics and ecology*, 32(1), 83–86.
- Tworcoski, T.** (2002) Herbicide effects of essential oils. *Weed science*, 50(4), 425–431.
- Wang, P., Mo, B., Long, Z., Fan, S., Wang, H. and Wang, L.** (2016) Factors affecting seed germination and emergence of *Sophora davidii*. *Industrial Crops and Products*, 87, 261–265.
- Weidenhamer, J. D., Macias, F. A., Fischer, N. H. and Williamson, G. B.** (1993) Just how insoluble are monoterpenes? *Journal of Chemical Ecology*, 19(8), 1799–1807.
- Weir, T. L., Park, S.-W. and Vivanco, J. M.** (2004) Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 472–479.
- Westoby, M., Falster, D. S., Moles, A. T., Vesk, P. A. and Wright, I. J.** (2002) Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33(1), 125–159.
- Williams, R. D. and Bartholomew, P. W.** (2011) Hairy vetch (*Vicia villosa*) seed size affects germination response to coumarin. *Allelopathy Journal*, 27(2), 237-244.
- Williams, R. D. and Bartholomew, P. W.** (2012) Radish (*Raphanus sativus*) seed size affects germination response to coumarin. *Allelopathy Journal*, 30(2), 271-280.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento deste estudo permitiu reportar novas evidências sobre a ação de fitotoxinas, especificamente um óleo essencial, sobre a germinação de sementes de diferentes tamanhos, constatando uma maior sensibilidade de sementes pequenas a fitotoxinas durante a germinação. Os resultados observados vão ao encontro do que tem sido reportado na literatura científica para outras fitotoxinas, exclusivamente em extratos aquosos, utilizando métodos semelhantes para testar a hipótese.

Durante a realização deste estudo, a ação fitotóxica de outro óleo essencial (*Eucalyptus saligna* Sm.) também foi testada sobre uma parte da amostra de acessos utilizados nos experimentos com óleo de *B. psidioides*, tendo sido observados resultados similares. Ainda que estes estudos preliminares sugiram que este padrão de resposta, com sementes pequenas mais suscetíveis aos efeitos fitotóxicos, tenda a se manter para outros óleos essenciais fitotóxicos, futuros estudos podem ser conduzidos para corroborar esta hipótese, e permitir maiores generalizações sobre o tema.

Conforme evidenciado nos resultados, pela correlação e regressão, três acessos chamaram atenção pelo desvio predito do valor da ED_{50} pelo modelo da regressão. Os acessos são caracterizados por serem sementes oleaginosas, o que cria perspectivas para testar a hipótese de que o tipo de reserva predominante nas sementes também pode afetar sua suscetibilidade aos efeitos fitotóxicos de óleos essenciais.

Normalmente, estudos de alelopatia usam poucas espécies comerciais para testar o potencial fitotóxico de aleloquímicos em ensaios de laboratório, e, então, tentam fazer implicações de que no campo a alelopatia pode ser um fator relevante. Contudo, como a suscetibilidade das sementes tem se mostrado dependente do tamanho dos diásporos, torna-se relevante que, em estudos ecológicos, sementes de tipos e tamanhos representativos sejam usados, especialmente contemplando a diversidade encontrada no ambiente da potencial espécie alelopática estudada. Por exemplo, caso esteja sendo explorado o potencial alelopático de uma espécie florestal, em que as espécies simpátricas tendem a ter sementes grandes, usar alface como uma espécie para teste poderá superestimar o potencial alelopático da espécie em questão. Da mesma forma, para estudos que visam aplicação de fitotóxicos para controle de ervas daninhas, é oportuno a utilização das espécies que se pretende controlar ou estimular,

pois a fitotoxidez varia, sendo a massa das sementes um fator relevante.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarssen, L.W. and Jordan, C.Y. (2001) Between-species patterns of covariation in plant size, seed size and fecundity in monocarpic herbs. **Ecoscience**. 8, 471-477.
- Andrew, R.L., Wallis, I.R., Harwood, C.E., Henson, M. and Foley, W.J. (2007) Heritable variation in the foliar secondary metabolite sideroxylonal in *Eucalyptus* confers cross-resistance to herbivores. **Oecologia**. 153, 891-901.
- Albuquerque, M. B., Santos, R. C., Lima, L. M., Albuquerque M.F., Nogueira, R.J. M.C., Câmara, C.A.G. and Rezende, R.A. (2010). Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. **Agronomy for Sustainable Development**. 31(2), 379-395.
- Arditti, j. (1967) Factors affecting the germination of orchid seeds. **The Botanical Review**, Vol. 33, n. 1, 1-97p.
- Azirak, S. and Karaman, S. (2008) Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science**. 58, 88-92.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, 46(2), 446–475.
- Benech-Arnold, R. L. and Sánchez, R. A. (Ed.) **Handbook of seed physiology: applications to agriculture**. New York: Food Products Press. 480p.
- Bewley, J. D. and Black, M. (1982) **Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination**. Berlin: Springer-Verlag. 387p.
- Bewley, J.D. and Black, M. (1994) **Seeds: Physiology of Development and Germination**. New York: Plenum Press.
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M. and Nonogaki, H. (2013) **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy**. New York, Springer.
- Bewley, J D. (1997) Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Vol. 9, 1055-1066.
- Biswas, K. K., Foster, A. J., Aung, T., and Mahmoud, S. S. (2009) Essential oil production: relationship with abundance of glandular trichomes in aerial surface of plants. **Acta physiologiae plantarum**, 31(1), 13–19.
- Burgos, N. R. and Talbert, R. E. (2000) Differential activity of allelochemicals from *Secale cereale* in seedling bioassays. **Weed Science**, 48(3), 302–310.
- Copeland, L. and McDonald, M. B. (1995) **Principles of Seed Science and Technology**. New York: Chapman & Hall. 3^a ed. 409p.
- Copolovici, L. O., Filella, I., Llusia, J., Niinemets, Ü., and Penuelas, J. (2005). The capacity for thermal protection of photosynthetic electron transport varies for different monoterpenes in *Quercus ilex*. **Plant Physiology**, 139(1), 485–496.
- De-Almeida, L. F. R., Frei, F., Mancini, E., De Martino, L., and De Feo, V. (2010). Phytotoxic activities of Mediterranean essential oils. **Molecules**, 15(6), 4309–4323.
- Doyle, J. A. (2006). Seed ferns and the origin of angiosperms. **The Journal of the Torrey Botanical Society**, 133(1), 169–209.
- Einhellig, F.A. (2002) The physiology of allelochemical action: Clues and views. **Allelopathy: from Molecules to Ecosystems**, 1-23.

- Einhellig, F. A., Rasmussen, J. A., Hejl, A. M., and Souza, I. F. (1993). Effects of root exudate sorgoleone on photosynthesis. **Journal of Chemical Ecology**, *19*(2), 369–375.
- Eriksson, O. (2008) Evolution of seed size and biotic seed dispersal in angiosperms: Paleocological and neocological evidence. **International Journal of Plant Sciences**. 169, 863-870.
- Fernando, N., Humphries, T., Florentine, S. K., and Chauhan, B. S. (2016). Factors Affecting Seed Germination of Feather Fingergrass (*Chloris virgata*). **Weed Science**, *64*(4), 605–612.
- Ferreira, A.G. and Borghetti, F. (2004) **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 323p.
- Filho, M.J. (2005) **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. v.12. Piracicaba: Fealq.
- Han, C., and Yang, P. (2015). Studies on the molecular mechanisms of seed germination. **PROTEOMICS**, *15*(10), 1671–1679.
- Hanley, M.E. et al. (2007) Seed size and seedling growth: differential response of Australian and British Fabaceae to nutrient limitation. **New Phytologist**. 174, 381-388.
- Henery, M.L. and Westoby, M. (2001) Seed mass and seed nutrient content as predictors of seed output variation between species. **Oikos**. 92, 479-490.
- Huang, M., Sanchez-Moreiras, A. M., Abel, C., Sohrabi, R., Lee, S., Gershenzon, J., and Tholl, D. (2012). The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. **New Phytologist**, *193*(4), 997–1008.
- Inderjit, Seastedt, T. R., Callaway, R. M., Pollock, J. L., Kaur, J., and others. (2008). Allelopathy and plant invasions: traditional, congeneric, and bio-geographical approaches. **Biological Invasions**, *10*(6), 875–890.
- Jensen, K. and Gutkunst, K. (2003) Effects of litter on establishment of grassland plant species: the role of seed size and successional status. **Basic and Applied Ecology**. 4, 579-587.
- Karasawa, M. M. G. (2009) **Diversidade Reprodutiva de Plantas**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética – SBG. 113 p.
- Lazarotto, D. C., da Silva, E. R., Pawlowski, Â., Ricachenevsky, F. K., Zini, C. A. and Soares, G. L. G. (2017) Phytotoxic effects of *Baccharis psiadioides* (Asteraceae) volatiles on different phases of plant development. **Journal of Essential Oil Research**, 1–7.
- Lazarotto, D. C., Pawlowski, Â., da Silva, E. R., Schwambach, J. and Soares, G. L. G. (2014) Phytotoxic effects of *Heterothalamus psiadioides* (Asteraceae) essential oil on adventitious rooting. **Acta physiologiae plantarum**, *36*(12), 3163–3171.
- Leishman, M.R. and Westoby, m. (1994a) Hypotheses on seed size - Tests using the semiarid Flora of Western New-South-Wales, Australia. **American Naturalist**. 143, 890-906.
- Leishman, M. R., Wright, I. J., Moles, A. T. and Westoby, M. (2000) The evolutionary ecology of seed size,. pp. 31–57 in Fenner, M. (Ed.) **Seeds: the ecology of regeneration in plant communities**. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Levin, S.A. and Muller-Landau, H.C. (2000) The evolution of dispersal and seed size in plant communities. **Evolutionary Ecology Research**. 2, 409-435.
- Liebman, M and Sundberg, D.N. (2006) Seed mass affects the susceptibility of weed and crop species to phytotoxins extracted from red clover shoots. **Weed Science**. 54, 340-345.
- Linhart, Y. B., Gauthier, P., Keefover-Ring, K., and Thompson, J. D. (2014). Variable phytotoxic effects of *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) terpenes on associated species. **International Journal of Plant Sciences**, *176*(1), 20–30.

- Linkies, A., Graeber, K., Knight, C., and Leubner-Metzger, G. (2010). The evolution of seeds. **New Phytologist**, *186*(4), 817–831.
- Loreto, F., Mannozi, M., Maris, C., Nascetti, P., Ferranti, F., and Pasqualini, S. (2001). Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. **Plant Physiology**, *126*(3), 993–1000.
- Lotina-Hennsen, B., King-Diaz, B., Aguilar, M.I., Terrones, M.G.H., 2006. Plant secondary metabolites. Targets and mechanisms of allelopathy, in: Reigosa, M.J., Pedrol, N.,23 González, L. (Eds.), **Allelopathy: A physiological process with ecological implications**. Springer, Netherlands, pp. 229-265.
- Macías, F. A., Molinillo, J. M., Varela, R. M. and Galindo, J. C. (2007) Allelopathy—a natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, *63*(4), 327–348.
- Macías, F. A., Galindo, J. C., and Molinillo, J. M. (2003). **Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals**. CRC Press
- Maffei, M. E., Gertsch, J., and Appendino, G. (2011). Plant volatiles: production, function and pharmacology. **Natural product reports**, *28*(8), 1359–1380.
- Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D.-T., Santoni, V., Shahzad, Z., and Verdoucq, L. (2015). Aquaporins in Plants. **Physiological Reviews**, *95*(4), 1321–1358.
- McCallum, E. J., Cunningham, J. P., Lückner, J., Zalucki, M. P., De Voss, J. J., and Botella, J. R. (2011). Increased plant volatile production affects oviposition, but not larval development, in the moth *Helicoverpa armigera*. **Journal of Experimental Biology**, *214*(21), 3672–3677.
- McCormick, A. C., Unsicker, S. B., and Gershenson, J. (2012). The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. **Trends in plant science**, *17*(5), 303–310.
- Milberg, P., Andersson, L., and Thompson, K. (2000). Large-seeded spices are less dependent on light for germination than small-seeded ones. **Seed Science Research**, *10*(01), 99–104.
- Miransari, M., and Smith, D. L. (2014). Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, *99*, 110–121.
- Moles, A. T., Ackerly, D. D., Webb, C. O., Tweddle, J. C., Dickie, J. B., and Westoby, M. (2005). A brief history of seed size. **Science**, *307*(5709), 576–580.
- Obroucheva, N. V. (2013). Aquaporins in seeds. **Seed Science Research**, *23*, pp 213-216
- Padovan, A., Keszei, A., Külheim, C., and Foley, W. J. (2014). The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochemistry reviews**, *13*(3), 695–716.
- Pawlowski, Â., Kaltchuk-Santos, E., Brasil, M. C., Caramão, E. B., Zini, C. A., and Soares, G. L. G. (2013). Chemical composition of *Schinus lentiscifolius* March. essential oil and its phytotoxic and cytotoxic effects on lettuce and onion. **South African Journal of Botany**, *88*, 198–203.
- Pawlowski, Â., Kaltchuk-Santos, E., Zini, C. A., Caramão, E. B., and Soares, G. L. G. (2012). Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. **South african journal of botany**, *80*, 96–103.
- Petersen, J., Belz, R., Walker, F., and Hurle, K. (2001). Weed suppression by release of isothiocyanates from turnip-rape mulch. **Agronomy Journal**, *93*(1), 37–43.
- Pichersky, E. and Gershenson, J. (2002) The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**. *5*, 237-243.
- Pinto-Zevallos, D. M., Martins, C. B., Pellegrino, A. C., and Zarbin, P. H. (2013). Compostos

- orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Quim Nova**, 36, 1395–1405.
- Putnam, A. R., and DeFrank, J. (1983). Use of phytotoxic plant residues for selective weed control. **Crop Protection**, 2(2), 173–181.
- Raven, P. H. et al. (2007) **Biologia vegetal** 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 830p.
- Reigosa, M. J., Pedrol, N., and González, L. (2006). **Allelopathy: a physiological process with ecological implications**. Springer
- Reigosa, M. J. et al. (1999) Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 5, p. 577-608
- Reigosa, M., Gomes, A.S., Ferreira, A.G., Borghetti, F., 2013. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica** 27, 629-646.
- Rojas-Arechiga, M. et al. (2013) Seed size and photoblastism in species belonging to tribe Cactaceae (Cactaceae). **Journal of Plant Research**. 126, 373-386.
- Rolli, E. et al. (2014) Comparative phytotoxicity of 25 essential oils on pre- and post-emergence development of *Solanum lycopersicum* L.: A multivariate approach. **Industrial Crops and Products**. 60, 280-290.
- Schmidt-Silva, V., Pawlowski, Â., dos Santos, E. K., Zini, C. A., and Soares, G. L. (2011). Cytotoxicity of essential oils from two species of *Heterothalamus* (Asteraceae). **Australian Journal of Botany**, 59(7), 682–691.
- Schmidt-Silva, V. (2012) **Potencial alelopático do óleo essencial de espécies de Heterothalamus nativas do Rio Grande do Sul**. PhD Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.
- Scognamiglio, M., D'Abrosca, B., Esposito, A., Pacifico, S., Monaco, P., and Fiorentino, A. (2013). Plant growth inhibitors: allelopathic role or phytotoxic effects? Focus on Mediterranean biomes. **Phytochemistry reviews**, 12(4), 803–830.
- Setubal R.S., Boldrini I.I. (2010) Floristic and characterization of grassland vegetation at a granitic hill in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Biociências**, 8:85–111
- Silva, E. R., Ferreira, P. M., Overbeck, G. E. and Soares, G. L. (2015) Does the phytotoxic shrub *Heterothalamus psiadioides* affect a plant community through allelopathy? **Plant ecology**, 216(1), 87–97.
- Silva, E. R., Overbeck, G. E. and Soares, G. L. G. (2014) Phytotoxicity of volatiles from fresh and dry leaves of two Asteraceae shrubs: evaluation of seasonal effects. **South African Journal of Botany**, 93, 14–18.
- Silvertown, J. (1989) The paradox of seed size and adaptation. **Trends in Ecology & Evolution**. 4, 24-26.
- Stolarska, A. and Wiczorek, A. (2015) The effect of some essential oils on adenine nucleotide levels and activity of oxidative stress enzymes in caraway (*Carum carvi* L.). **Journal of Essential Oil Research**. 27, 343-354.
- Suyenaga, E. S., Apel, M. A., Chaves, C. G., Zuanazzi, J. A., and Henriques, A. T. (2004). Essential oil composition of *Heterothalamus psiadioides* Less. **Biochemical systematics and ecology**, 32(1), 83–86.
- Tworowski, T. (2002). Herbicide effects of essential oils. **Weed science**, 50(4), 425–431.
- Vázquez-Ramos, J. M. and Sánchez, M. D. P. (2003). The cell cycle and seed germination. **Seed Science Research**, 13, 113-130.

- Wang, P., Mo, B., Long, Z., Fan, S., Wang, H., and Wang, L. (2016). Factors affecting seed germination and emergence of *Sophora davidii*. **Industrial Crops and Products**, 87, 261–265.
- Weir, T. L., Park, S.-W., and Vivanco, J. M. (2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current opinion in plant biology**, 7(4), 472–479.
- Williams, R.D. and Bartholomew, P.W. (2011) Hairy vetch (*Vicia villosa*) seed size affects germination response to coumarin. **Allelopathy Journal**. 27, 237-244.
- Williams, R.D. and Bartholomew, P.W. (2012) Radish (*Raphanus sativus*) seed size affects germination response to coumarin. **Allelopathy Journal**. 30, 271-279.

5 APÊNDICES

Supplementary Material

Table S1. Details from origin of each accessions used in the study

Family	Specie	Origin
Asteraceae	<i>Matricaria recutita</i>	ISLA Seeds
Asteraceae	<i>Helianthus annus</i> ‘Multissol’	BRSeeds
Brassicaceae	<i>Eruca sativa</i>	ISLA Seeds
Brassicaceae	<i>Brassica oleraceae</i> ‘Bortytis’	ISLA Seeds
Brassicaceae	<i>Nasturium officinale</i>	ISLA Seeds
Brassicaceae	<i>Raphanus sativus</i> ‘Acanthiformis’	ISLA Seeds
Fabaceae	<i>Trifolium repens</i>	PGW Seeds
Fabaceae	<i>Lotus corniculatus</i>	PGW Seeds
Fabaceae	<i>Crotalaria spectabilis</i>	BRSeeds
Fabaceae	<i>Cajanus cajan</i> ‘IAPAR 43’	BRSeeds
Fabaceae	<i>Lens culinaris</i>	Embrapa
Lamiaceae	<i>Origanum vulgare</i>	ISLA Seeds
Pedaliaceae	<i>Seasamun indicum</i> ‘IAC Ouro’	IAC (SP)
Poaceae	<i>Oryza sativa</i> ‘IAC 500’	IAC (SP)
Poaceae	<i>Eragrostis plana</i>	Own collection
Poaceae	<i>Zea mays</i> ‘IAC 125 Pipoca’	IAC (SP)
Poaceae	<i>Triticum aestivum</i> ‘TBIO Sossego’	BIOTRIGO
Poaceae	<i>Paspalum notatum</i>	PGW Seeds
Poaceae	<i>Oryza sativa</i> ‘BRS Nipon’	IRGA
Poaceae	<i>Triticum aestivum</i> ‘TBIO Parrudo’	BIOTRIGO
Poaceae	<i>Zea mays</i> ‘IAC 8390’	IAC (SP)