



AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS LABORATORIAIS PARA BIOENSAIOS ALELOPÁTICOS

Alexandre Martins Abdão dos Passos¹, Vivianni Pacheco Dantas Leite², Henrique Nery Cipriani¹, Frederico José Evangelista Botelho¹

1. Pesquisador, Doutor da Embrapa Rondônia (alexandre.abdao@embrapa.br)
2. Mestranda em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Universidade Federal de Rondônia

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

RESUMO

Objetivou-se avaliar a germinação e o vigor de sementes de alface sob diferentes condições controladas, a fim de estabelecer um protocolo padrão para avaliação de bioensaios alelopáticos. Para isto avaliaram-se 5 níveis de água (5, 7, 8, 10 e 13 mL) em caixas gerbox contendo duas folhas de papel filtro, duas formas de semeadura e proteção das caixas com plástico. O experimento foi conduzido em câmara de germinação a 20 °C, com fotoperíodo de 12 horas, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Observou-se máxima porcentagem de germinação das sementes de alface no volume de 9,6 mL de água sem vedação plástica das gerbox, ou volumes de água acima de 5 mL com vedação. As sementes apresentaram maior índice de velocidade de germinação (IVG) na forma de semeadura sobre papel. Concluiu-se que um protocolo para avaliar bioatividade de extratos sobre a germinação e o vigor de sementes de alface inclui semeadura sobre papel, utilizando-se 10 mL de extrato (41,3 $\mu\text{L cm}^{-2}$ ou 0,4 mL cipsela⁻¹) sem vedação das caixas gerbox.

PALAVRAS-CHAVE: Água, alelopatia, germinação, *Lactuca sativa*, vigor.

EVALUATION OF LABORATORY PROTOCOLS FOR ALLELOPATHIC BIOASSAYS

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the germination and vigor of lettuce seeds under different water volumes, seed placing (on paper and between paper sheets) and with or without gerbox sealing in order to develop a protocol for allelopathic bioassays. Five water rates (5, 7, 8, 10 and 13 mL) were assessed, using gerbox containing two sheets of filter paper. The experiment was conducted in a B.O.D. (biochemical oxygen demand) with a photoperiod of 12 hours in a completely randomized design with four replicates. The results showed higher germination of lettuce seeds in the volume of 10 mL of water not sealing the gerbox; or any water volume (above 5 mL) sealing the gerbox. Regarding the germination velocity index (GVI), the seeds showed better performance when sown over the paper sheets. It is concluded that a protocol to assess bioactivity of extracts on the germination and vigor of seeds of *Lactuca sativa* L includes seeding over paper, using unsealed gerbox with 10 mL of extract (41.3 $\mu\text{L cm}^{-2}$ or 0.4 mL cypsela⁻¹).

KEYWORDS: Allelopathy, germination, *Lactuca sativa*, vigor, water.

INTRODUÇÃO

A alelopatia consiste na interação química entre plantas, mediante a presença de metabólitos secundários liberados no meio (IAS, 1996). Estes metabólitos podem ser fontes de novos compostos com potencial biocida (MAIRESSE et al., 2007). Para tal, bioensaios alelopáticos são realizados em condições controladas de laboratórios, constituindo uma importante etapa para a identificação de aleloquímicos promissores (CÂNDIDO et al., 2010).

Contudo, há uma ampla variedade de procedimentos empregados nesses estudos, o que indica falta de padronização (SIMÕES et al., 2013; REIGOSA et al., 2013). Em bioensaios alelopáticos é fundamental o controle das condições ambientais para que resultados de inibição ou promoção do desenvolvimento da semente e crescimento de plântulas não sejam confundidos com outros fatores de interferência como a falta ou excesso de água, níveis de temperatura, luz, qualidade fisiológica da semente, dentre outros (SOUZA FILHO et al., 2010). A padronização dos processos laboratoriais nesse tipo de estudo facilita a sua reprodução, permite comparações entre os estudos e melhor compreensão do complexo fenômeno da alelopatia (SOUZA FILHO et al., 2010).

Em estudos alelopáticos, são utilizadas espécies sensíveis aos aleloquímicos, o que possibilita obter um indicativo dos efeitos alelopáticos das espécies doadoras. Nesse contexto, a alface (*Lactuca sativa* L.) é a espécie que vem sendo amplamente utilizada em ensaios para a identificação e determinação de efeitos alelopáticos, por apresentar sensibilidade aos metabólitos secundários, sendo considerada uma planta indicadora em experimentos envolvendo alelopatia (FERREIRA & AQUILA, 2000; CIPRIANI et al., 2014).

Dentre as metodologias empregadas nos bioensaios alelopáticos, o volume de extrato total utilizado por pesquisadores tem apresentado variações consideráveis (SOUZA FILHO et al. 1996; 2010; MARASCHIN-SILVA & AQUILA, 2006; PAVLOVIĆ et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014). Para ensaios com sementes, recomenda-se a utilização de um volume ótimo que garanta a germinação das sementes e pleno crescimento e expressão de vigor das plântulas. Sendo importante que haja a turgescência das sementes nas 24 horas subseqüentes à adição da solução aquosa à ser avaliada (SOUZA FILHO et al., 2010).

Acrescenta-se que testes de germinação com sementes de alface podem ser realizados com diferentes formas de semeadura quando se utiliza papel filtro (BRASIL, 2009). Outro procedimento que tem apresentado variações em bioensaios alelopáticos é a vedação ou não das tampas de placas de Petri ou caixas gerbox no intuito de reduzir a perda de água para que a semente germine apropriadamente (FERREIRA & AQUILA, 2000; CARVALHO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014).

Nesse sentido, objetivou-se nesse estudo, determinar condições de ensaios laboratoriais que propiciem a máxima germinação e expressão de vigor de sementes de alface a fim de estabelecer um protocolo para bioensaios alelopáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Sementes da Embrapa Rondônia no ano de 2013 utilizando um lote comercial de sementes (cipselas) de alface (*Lactuca sativa* L. cultivar Veneranda). Previamente ao ensaio, as sementes foram submetidas a testes para verificação do perfil do lote, obtendo-se um potencial

germinativo de 99%, pureza de 100%, e grau de umidade de 4,8% segundo Regras de Análises de Sementes (BRASIL, 2009).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 2 x 2, com quatro repetições. Os tratamentos constituíram de cinco níveis de água destilada: 5, 7, 8, 10 e 13 mL; ausência ou presença de vedação das caixas gerbox, fazendo uso de películas plásticas transparentes e duas formas de semeadura (sobre papel ou entre as folhas de papel).

Para o experimento utilizaram-se caixas de acrílico transparentes, do tipo gerbox, com dimensões de 11 x 11 x 4 cm e papel filtro com 10,5 x 10,5 cm. Os volumes de água foram aplicados previamente à deposição das cipselas nos papéis, sendo utilizados 25 cipselas e duas folhas de papel em cada gerbox (parcela). As quantidades de água utilizadas (níveis) podem ser expressas em 20,7; 28,9; 33,1; 41,3 e 53,7 $\mu\text{l cm}^{-2}$ de papel filtro ou 0,20; 0,28; 0,32; 0,40 e 0,52 mL cipsela⁻¹.

As gerbox foram acondicionadas em câmara de germinação do tipo *biochemical oxygen demand* (B.O.D.) com temperatura de 20 °C e fotoperíodo de 12 horas (BRASIL, 2009). Realizaram-se contagens diárias das sementes germinadas, durante um período de sete dias, sendo consideradas germinadas as sementes com radícula medindo, pelo menos, 2 mm de comprimento (SOUZA FILHO et al., 2010). Obteve-se a porcentagem de germinação, o índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962) e o tempo médio de germinação (TMG) (RANAL et al., 2009).

Após verificar os pressupostos básicos de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Teste de Cochran), os dados foram submetidos à análise de variância. Quando observada significância, realizou-se regressão para o fator volume de água. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software SISVAR[®] (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo da análise de variância, com a identificação dos tratamentos significativos, pode ser visualizado na Tabela 1.

TABELA 1 Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de germinação (TMG) de sementes de alface sob efeito de diferentes volumes de água (A), com ou sem vedação (V) e formas de semeadura (F).

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		G	IVG	TMG
Forma de semeadura (F)	1	204,80	26,07*	4,88*
Volume de água (A)	4	6189,30*	49,78*	1,65*
Vedação (V)	1	8323,20*	48,78*	0,01
F*A	4	101,30	6,45**	1,28*
F*V	1	7,20	0,09	0,20
A*V	4	2839,70*	29,05*	0,40
F*V*A	4	7,70	1,07	0,55**
Erro	60	203,20	2,41	0,19
CV(%)		16,95	20,85	14,02
Média		84,10	7,45	3,14

*, ** Significativos a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Por meio do desdobramento da interação A*V, observou-se efeito do volume de água apenas para o tratamento sem vedação na porcentagem de germinação das sementes de alface (Figura 1). As gerbox vedadas apresentaram maiores médias e pela não significância pode-se deduzir, que quando há vedação ou altos níveis de umidade do ar no interior dos gerbox, os menores níveis de água avaliados, são suficientes para que ocorra a adequada germinação das sementes.

Alguns autores recomendam volumes próximos do menor nível avaliado nesse trabalho, como o necessário para a condução de ensaios de alelopatia (MARASCHIN-SILVA & AQUILA 2006; BORELLA et al. 2010; COELHO et al., 2011). Observou-se um comportamento quadrático da germinação em função do volume de água para as gerbox sem vedação, com valor máximo de germinação (100%), obtido pela utilização de um volume de 9,6 mL de água.

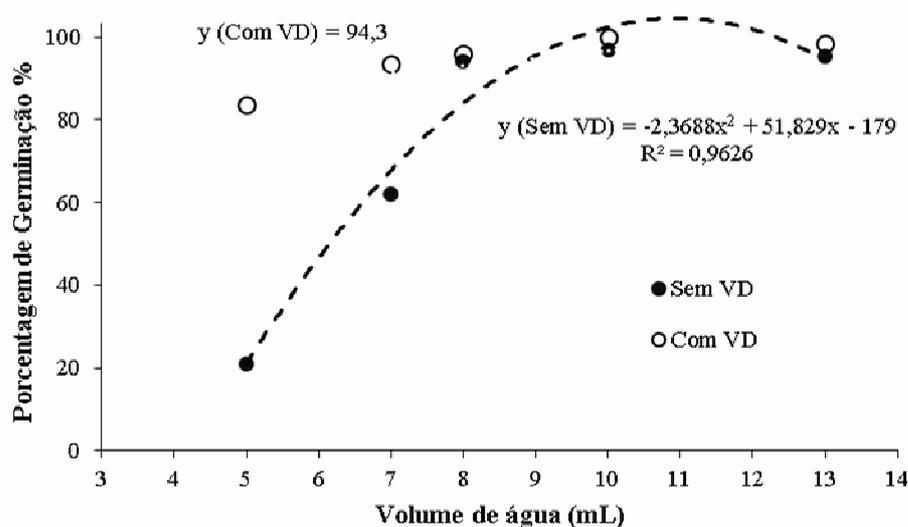


FIGURA 1 Efeito da vedação das caixas gerbox sobre a germinação de sementes de alface em diferentes volumes de água. **Sem VD:** sem vedação; **Com VD:** com vedação.

Os resultados corroboram com os estudos de ERASMO et al. (2011) que obtiveram um alto percentual de germinação (95%) das sementes de alface utilizando um volume de 10 mL de extratos aplicado em papel diariamente. Em outros estudos, relata-se percentuais similares de germinação (98,8%) das sementes de alface em volumes de água correspondentes a 8 mL, contudo, utilizando apenas uma folha de papel filtro como descrito por SILVEIRA et al. (2012); ou 12 mL, como relatado por CARVALHO et al. (2014) usando duas folhas, mas uma proporção de 0,24 mL por semente de alface, enquanto a dose desse estudo, de 10 mL, corresponde à 0,40 mL semente⁻¹. Em ambos os trabalhos, as sementes ficaram expostas à temperatura de 25 °C, diferente da utilizada neste estudo (20 °C). Neste caso, temperaturas maiores aumentam a quantidade de água evaporada do papel,

diminuindo a disponibilidade de água para a embebição das sementes, afetando desta forma o processo de germinação (BEWLEY et al., 2012).

Quanto ao vigor das sementes, para o índice de velocidade de germinação, observou-se significância nas interações F*A e A*V (Tabela 1). As formas de semeadura, entre papel e sobre papel, diferiram entre si para os diferentes volumes de água (Figura 2). Segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), os testes de germinação de sementes de alface podem ser realizados sobre papel, entre papel e sobre areia, utilizando-se duas ou mais folhas de papel como substrato para as sementes germinarem. Nesse estudo, as sementes de alface apresentaram maior vigor quando dispostas sobre papel, mais especificamente ao adicionar-se o volume de 10,8 mL de água (IVG de 9,8 sementes germinadas dia⁻¹). Já para a semeadura entre papel, o máximo IVG (8,8) foi observado pela utilização de 9,5 mL de água. Na literatura, as referências têm apresentado variação quanto ao número de papéis utilizado na germinação de sementes, tendo este fator, relação direta com o volume de extrato empregado (CORSATO et al. 2010; COELHO et al., 2011; CARVALHO et al. 2014).

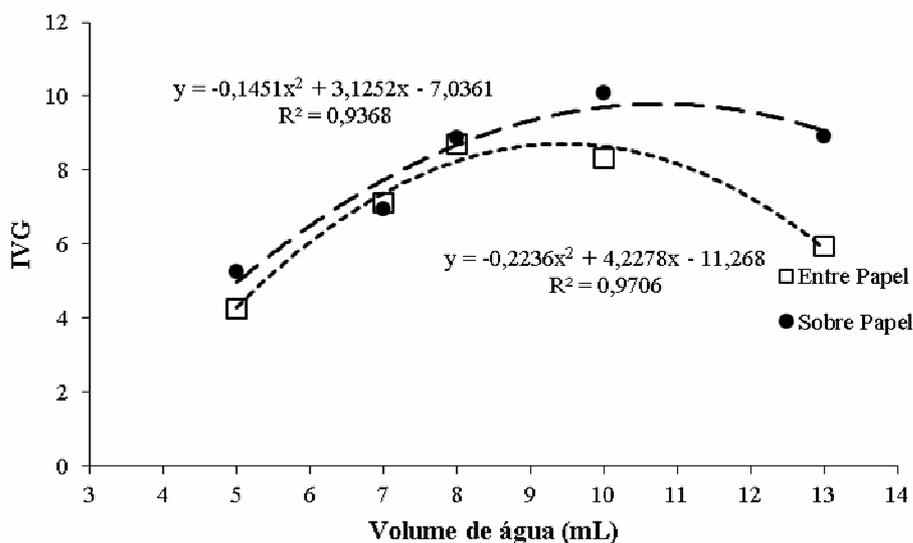


FIGURA 2 Efeito das formas de semeadura sobre o índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de alface em diferentes volumes de água.

Similarmente como na germinação, não se observou diferença no IVG entre os volumes de água quando as caixas gerbox foram lacradas (Figura 3). A ausência de vedação propiciou maiores IVG à medida que o volume de água aumentou, destacando o volume de 10,3 mL, observado no vértice da curva, que proporcionou um IVG de 9,6 sementes dia⁻¹. Observou-se uma redução do IVG (7,6) para o volume de 13 mL de água. Quanto maior o volume de extrato, menor é a disponibilidade de oxigênio nas placas, propiciando condições anaeróbicas à semente, que pode afetar o vigor das mesmas (MACÍAS et al., 2000).

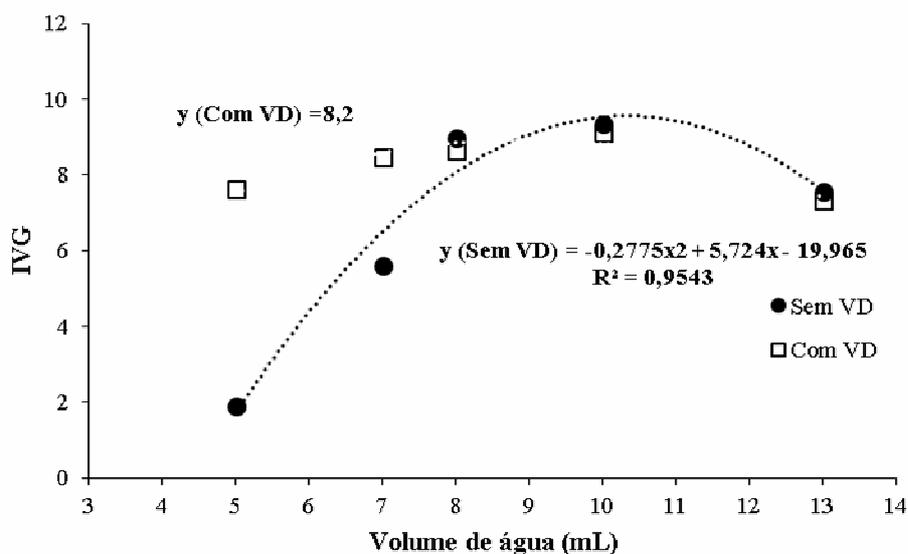


FIGURA 3 Efeito da vedação das caixas gerbox sobre o índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de alface em diferentes volumes de água. **Sem VD**: sem vedação; **com VD**: com vedação.

Independentemente do volume hídrico utilizado, as sementes apresentaram melhor desempenho quando as caixas gerbox foram vedadas. A vedação evita a perda de água por evaporação em bioensaios alelopáticos. Uma vez que a evaporação da água dos extratos implica em aumento da concentração, pode haver comprometimento dos resultados devido ao maior potencial osmótico da solução (FERREIRA & ÁQUILA, 2000).

Em função da praticidade e da variedade de câmaras de germinação disponíveis no mercado, na qual muitas não possuem sistemas de umidificação controlada, pelos resultados desse trabalho é demonstrado que a utilização de 10 mL de extrato aquoso em ensaios de alelopatia utilizando-se sementes de alface, sem a presença de vedação nas caixas gerbox pode ser o mais indicado nessas situações.

No estudo de SIMÕES et al. (2013), no qual avaliaram-se diferentes condições experimentais visando a padronização de algumas etapas de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos, recomenda-se o volume de extrato de 0,1 mL cipsela⁻¹. Contudo, no presente estudo, obteve-se melhores germinações e IVG utilizando-se o volume de 0,4 mL cipsela⁻¹. Os mesmos autores enfatizam que a variação no tipo e tamanho das placas influencia fatores como o volume de extrato a ser adicionado, o número de cipselas utilizado, dentre outros.

Avaliando-se o tempo médio de germinação das sementes, verificou-se efeito interativo das três fontes de variação (F*V*A) como observado na Tabela 1. Por meio do desdobramento dos efeitos, observou-se que as formas de semeadura diferiram entre si, ocorrendo comportamento diferenciado das sementes frente às doses de água somente na forma de semeadura entre papel (Figura 4).

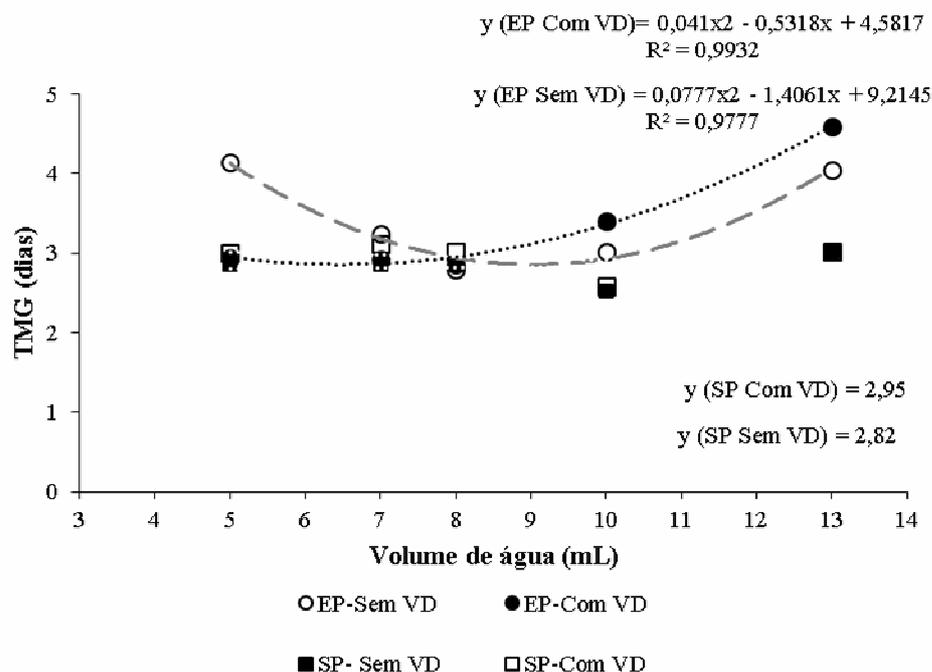


FIGURA 4 Efeito da forma de semeadura e da vedação das caixas gerbox sobre o Tempo Médio de Germinação (TMG) das sementes de alface em diferentes volumes de água. **SP**: sobre papel; **EP**: entre papel; **Sem VD**: sem vedação; **Com VD**: com vedação.

Ao utilizar a semeadura sobre papel, as sementes germinaram ao mesmo tempo, indiferente das doses de água utilizada. Da mesma forma, não houve comportamento diferenciado para os casos de vedação ou não vedação das gerbox nessa modalidade de semeadura (Figura 4).

Por outro lado, quando semeadas entre papel as sementes demonstraram um comportamento quadrático e diferenciado quando vedadas ou não. Quando não se utilizou a vedação, as médias diminuíram o tempo médio de germinação até o volume de 9,05 mL. A partir desse volume de água, as sementes apresentaram maior TMG, demonstrando um possível efeito de hipoxia nas sementes (BEWLEY et al., 2012), o que afetando o aparato fisiológico da semente, impede o pleno desenvolvimento do eixo embrionário da semente e a protrusão radicular (TAIZ & ZEIGER, 2009).

O efeito de hipoxia foi mais pronunciado quando houve vedação das gerbox, pois o volume de apenas 6,5 mL, promoveu o início da germinação em 2,86 dias. A partir do volume de 6,5 mL, observou-se um significativo incremento na curva alcançando valores próximos de cinco dias para o início da germinação, no volume de 13 mL gerbox⁻¹, devido à menor disponibilidade de oxigênio para as sementes (BEWLEY et al., 2012). MACÍAS et al. (2000) ressaltam que, quanto maior o volume de extrato, menor é a disponibilidade de oxigênio nas placas, propiciando condições anaeróbicas à semente.

Em bioensaios alelopáticos o volume de extrato total tem variado significativamente (SOUZA FILHO et al., 2010; LIMA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2012; PAVLOVIĆ et al., 2013). Nesse trabalho, o volume de 10 mL de água apresentou-se como o mais adequado para testes de germinação e vigor em bioensaios alelopáticos em caixas gerbox não vedadas. É importante destacar que o

volume utilizado deve estar de acordo com o tamanho das placas e presença ou não de umidificação na câmara de germinação. Pois o excesso de umidade gera condições de hipóxia ou anoxia que, mesmo temporárias, são limitantes para a germinação das sementes (SOUZA FILHO et al., 2010).

CONCLUSÃO

Um protocolo eficaz, prático e rápido para avaliar bioatividade de extratos aquosos utilizando sementes de *Lactuca sativa* inclui:

- Semeadura sobre papel;
- Utilização de 10 mL ($41,3 \mu\text{L cm}^{-2}$ ou $0,4 \text{ mL cipsela}^{-1}$) de extrato aquoso quando não houver umidificação automática da câmara de germinação e sem utilização de vedação das caixas gerbox.

REFERÊNCIAS

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.; HILHORST, H.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. Springer, 2012.

BORELLA, J.; TUR, C.M.; PASTORINI, L.H. Atividade alelopática de extratos aquosos de folhas de *Rollinia sylvatica*. **Revista Biociências**, v. 16, n. 2, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

CÂNDIDO, A. C. S.; DIAS A.C.R.; SERRA A.P.; CHRISTOFFOLETI P.J.; SCALON S. DE P.Q.; PERES M.T.L.P. Potencial alelopático de lixiviados das folhas de plantas invasoras pelo método sanduiche. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, 2010.

CARVALHO, W. P.; CARVALHO, G. J. DE; NETO, D. DE O. A.; TEIXEIRA, L. G. V. Alelopatia de extratos de adubos verdes sobre a germinação e crescimento inicial de alface. **Biosciense Journal**, v. 30, supplement 1, p. 1-11, 2014.

CIPRIANI, F. A.; KAPLAN, M.A.C.; ISAIAS, R. M. dos S.; SOARES, G. L. G. Avaliação da fitotoxidez de *Tecoma stans* (L.) Kunth. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 21, n.1, 2014.

COELHO, M. F. B.; MAIA, S. S. S.; OLIVEIRA, A. K.; DIÓGENES, F. E. P. Atividade alelopática de extrato de sementes de juazeiro. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 108-111, 2011.

CORSATO, J. M., FORTES, A. M. T., SANTORUM, M., & LESZCZYNSKI, R. Efeito alelopático do extrato aquoso de folhas de girassol sobre a germinação de soja e pêscoço-preto. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 353-360, 2010.

ERASMO, E. A. L. de; AZEVEDO, W. R. da; COSTA, N. V.; ALVES, P. L. D. C. A. Efeito de extratos de adubos verdes sobre *Lactuca sativa* e *Digitaria horizontalis*. **Bragantia**, v. 70, n. 3, p. 529-537, 2011.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 1, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY – IAS. **Constitution and Bylaws**. Cádiz-Spain, IAS Newsletter, 1996.

LIMA, C. P. D.; CUNICO, M. M.; TREVISAN, R. R.; PHILIPPSEN, A. F.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, p. 331-336, 2011.

MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MAIRESSE, L. A. S.; COSTA, E. C.; FARIAS, J. R.; FIORIN, R. A. Bioatividade de extratos vegetais sobre alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista da FZVA**, v. 14, n. 2, p. 1-12, 2007.

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

OLIVEIRA, A. K.; PEREIRA, K. C.; MULLER, J. A.; MATIAS, R. Phytochemical analysis and allelopathic effects of *Pouteria ramiflora* bark on lettuce seeds germination. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 41-47, 2014.

PAVLOVIĆ, P.; DJURDJEVIĆ, L.; JARIĆ, S.; KOSTIĆ, O.; PAVLOVIĆ, D.; PAVLOVIĆ, M.; MITROVIĆ, M. Forestry Research Methods. **Allelopathy Journal**, v. 31, n. 2, p. 233-280, 2013.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. de; FERREIRA, W. R.; MENDES-RODRIGUES, C. Calculating germination measurements and organizing spreadsheets. **Brazilian Journal of Botany**, v. 32, n. 4, p. 849–855, 2009.

REIGOSA, M.; GOMES, A. S.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v.27, n.4, p.629–646, 2013.

SILVEIRA, P. F.; MAIA, S. S. S.; COELHO, M. de F. B. Potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. na germinação de *Lactuca sativa* L. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 3, p. 472-477, 2012.

SIMÕES, M. S.; MADAIL, R. H.; BARBOSA, S.; NOGUEIRA, M. de L. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. **Revista Biotemas**, v. 26, n. 3, 2013.

SOUZA FILHO, A. P. S.; RODRIGUES, L. R. A.; RODRIGUES, T. J. D. Efeitos de extratos aquosos de assa-peixe sobre a germinação de três espécies de braquiária. **Planta Daninha**, v. 14, n. 2, 1996.

SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. da S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório–Revisão Crítica. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 613 p.