

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA**

**LUCIANO NUNES LEITE**

**L-MIMOSINA (*Leucaena leucocephala* (LAMBERT) DE WIT, FABACEAE), UM  
INIBIDOR DE DESENVOLVIMENTO**

**Uberlândia – MG  
Julho – 2012**

**LUCIANO NUNES LEITE**

**L-MIMOSINA (*Leucaena leucocephala* (LAMBERT) DE WIT, FABACEAE), UM  
INIBIDOR DE DESENVOLVIMENTO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Agronomia, da Universidade Federal  
de Uberlândia, para obtenção do grau de  
Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Marli Aparecida Ranal

**Uberlândia- MG  
Julho - 2012**

**LUCIANO NUNES LEITE**

**L-MIMOSINA (*Leucaena leucocephala* (LAMBERT) DE WIT, FABACEAE), UM  
INIBIDOR DE DESENVOLVIMENTO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Agronomia, da Universidade Federal  
de Uberlândia, para obtenção do grau de  
Engenheiro Agrônomo.

Aprovado pela Banca Examinadora em 31 de julho de 2012

MSc. João Paulo Ribeiro de Oliveira  
Membro da Banca

MSc. Patrícia Umeda Grisi  
Membro da Banca

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Marli Aparecida Ranal  
Orientadora

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, Ademilton da Silva Leite e Sílvia Vanda da Silva Nascimento Leite, por minha existência, pelo exemplo de superação pessoal, apoio incondicional e socorro nos momentos difíceis da vida, em especial no decorrer da Graduação.

Agradeço à minha orientadora, Professora Marli Aparecida Ranal, que numa simples aula prática conquistou-me por sua sagacidade e ética; fez-me ver a ciência como mais que uma parte da vida, mas a forma de expressarmos aquilo que pensamos e desejamos da sociedade.

Agradeço ao Professor Roberto Chang, por seu apoio e paciência com minhas ideias nebulosas a respeito dos mistérios da Química, por ceder seu tempo a um leigo e acreditar em minhas expectativas.

Agradeço a Rayssa Camargo de Oliveira, companheira de horas boas e ruins, por sua dedicação incondicional aos meus devaneios e ilusões, por resgatar-me das nuvens e trazer-me à realidade e vice-versa.

Agradeço ao colega de laboratório e conselheiro João Paulo Ribeiro de Oliveira, por nossas discussões, às vezes cômicas, sempre produtivas, sobre o natural e o sobrenatural.

Agradeço aos meus irmãos, Patrick Nunes Leite e Camille Nunes Leite, que dedicaram vários sábados e domingos para acompanhar-me em minhas leituras diárias, pela paciência e perseverança junto a um irmão às vezes intransigente, mas agradecido.

Agradeço aos meus amigos do curso de Agronomia, pela convivência e lealdade, em tempos tão turbulentos como o nosso período de estudos profissionais.

Agradezco al Profesor José Alfredo Domínguez Valenzuela, por elucidar en mi mente los misterios de la maleza, por su ejemplo de conducta frente a las adversidades de la sociedad.

Agradeço a todos aqueles que de alguma maneira me ajudaram direta ou indiretamente neste trabalho, com ideias, sugestões, críticas, e que porventura não tenha mencionado aqui.

## SUMÁRIO

PRÓLOGO .....	5
INTRODUÇÃO GERAL .....	6
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	13
CAPÍTULO I L-MIMOSINA NA EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS DE TOMATEIRO ORIUNDAS DE SEMENTES CONTAMINADAS POR <i>Pythium</i> sp. ....	17
RESUMO .....	18
ABSTRACT .....	18
INTRODUÇÃO .....	19
MATERIAL E MÉTODOS .....	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	24
CAPÍTULO II L-MIMOSINA NA EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS DE FEDEGOSO ( <i>Senna occidentalis</i> (L.) Link) .....	26
RESUMO .....	27
ABSTRACT .....	27
INTRODUÇÃO .....	28
MATERIAL E MÉTODOS .....	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33
CAPÍTULO L-MIMOSINA NA EMERGÊNCIA E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE FEIJOEIRO ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) .....	35
RESUMO .....	36
ABSTRACT .....	36
INTRODUÇÃO .....	37
MATERIAL E MÉTODOS .....	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45
CONCLUSÕES .....	47

## PRÓLOGO

O estabelecimento das sociedades humanas em núcleos sésseis de convivência ocorreu devido à maior das descobertas do homem, a Agricultura. Desde então, o homem vem alterando seu modo de pensar e produzir em função das condições que lhe são impostas. Entre os desafios que enfrenta diariamente para garantir a continuidade de sua espécie e o desenvolvimento de suas atividades no campo, estão os organismos ditos prejudiciais aos cultivos, entre eles as plantas daninhas.

Durante muitos séculos, o homem, por incapacidade ou falta de recursos, tolerava a presença dessas plantas, mesmo tendo suas atividades laborais e o rendimento de sua lavoura prejudicados por elas. A evolução das técnicas de cultivo acarretou também no aprimoramento das medidas e tratos de controle dessas plantas. O ápice das conquistas agrícolas do homem foi vislumbrado com o aparecimento do controle químico de plantas, meio pelo qual pôde, enfim, libertar-se desse problema tão antigo.

No entanto, o uso desse novo método de controle trouxe consigo uma série de problemas que não podia ou não desejava imaginar. Entre os principais problemas da utilização dos herbicidas, está a dependência de produtos oriundos de recurso natural não renovável em curto prazo, o que torna seus produtos onerosos. A procura por novas fontes de oriundas de recursos renováveis faz vir à tona uma classe de compostos de origem vegetal e microbiana, cujo princípio da existência está alicerçado sob as mesmas bases conceituais da utilização de herbicidas para a proteção de plantas sensíveis à competição – os chamados compostos alelopáticos.

Dessa forma, a necessidade por investigações a cerca da viabilidade da utilização desses compostos segundo suas características químicas, físicas e biológicas no meio impulsionaram a proposta de estudo da aplicabilidade do principal aleloquímico sintetizado por *Leucaena leucocephala* (Lambert) de Wit, a L-mimosina, no controle de plantas daninhas.

## INTRODUÇÃO GERAL

Desde os primórdios da Agricultura, as plantas que infestam espontaneamente as áreas de ocupação antrópica, não utilizadas como alimento, fibras ou forragem, eram consideradas indesejáveis. Com o desenvolvimento da sociedade humana, promovido pela evolução agrícola e pecuária, as áreas destinadas à atividade rural foram expandidas, com a coalescência de áreas destinadas aos mesmos fins, ocasionando a ampla distribuição de pragas, patógenos e plantas indesejáveis. Nesse contexto, as comunidades de plantas indesejáveis ou daninhas tornaram-se cada vez mais densas e diversificadas, com profunda especialização na ocupação dos agroecossistemas (MORTIMER, 1990).

De maneira geral, as plantas daninhas puderam chegar a esse patamar de importância na conjuntura rural devido, principalmente, às suas características morfológicas e fisiológicas, que contribuem para as mais variadas e características adaptações ao meio. As plantas daninhas caracterizam-se por ocuparem áreas com grande intensidade de distúrbios ao crescimento vegetal, por isso são consideradas plantas pioneiras do ponto de vista ecológico (PITELLI; PITELLI, 2004). Segundo Harper (1977), entre as características encontradas nas plantas pioneiras, pode-se destacar como essencial para sua permanência nos ambientes hostis a elevada produção de diásporos em larga faixa de condições ambientais, dotados de adaptações para disseminação em curtas e longas distâncias e de diversificados e complexos tipos de dormência. Rápido crescimento vegetativo e florescimento e produção de estruturas reprodutivas alternativas se aliam à grande facilidade de combinação entre os indivíduos, gerando variabilidade genética expressiva, o que dá origem a populações praticamente totipotentes. Essa versatilidade se expressa de diferentes formas, como a capacidade de utilização de processos especiais de competição pela sobrevivência como alelopatia e hábito trepador.

Essas características presentes em maior ou menor grau contribuem para o estabelecimento e manutenção da flora infestante no campo, cuja presença pode condicionar uma série de fatores bióticos e abióticos sobre as plantas cultivadas que irão interferir nos processos fisiológicos e fitotécnicos da cultura infestada (ESPINOSA-GARCÍA; SARUKHÁN, 1997). Essa interferência pode se dar de maneira direta, quando a presença das plantas daninhas ocasiona menor desenvolvimento dos cultivos, ou indireta, quando há o prejuízo da qualidade final do produto desejado ou o aumento do custo para obtê-lo (PITELLI; PITELLI, 2004). No entanto, a base fisiológica que explica a superioridade das plantas daninhas frente à competição ainda não foi totalmente esclarecida, uma vez que

ambas, daninha ou cultivo, são prejudicadas, mas na soma dos efeitos, a espécie de interesse sempre é a mais afetada (LINS, 2008).

Dentre os fatores de interferência direta no ciclo da cultura, está a competição, que se define pela disputa entre dois vegetais por nutrientes minerais essenciais, luz, água e espaço. Esse fator pode ser agravado pela diferença de desenvolvimento entre a cultura e a planta daninha, tendo esta última maior sistema radicular, com conseqüente maior exploração do perfil do solo, por exemplo (PITELLI; PITELLI, 2004).

Outra interação entre planta daninha e cultura é a alelopatia, por meio da qual, infestante e cultivada podem interferir em processos fisiológicos diversos uma da outra, devido à ação de substâncias químicas secretadas ou disponibilizadas no ambiente via resíduos depositados sobre o solo ou pelo próprio organismo vivo. Também é considerada interferência direta a contaminação de lotes de sementes e fibras cultivadas por sementes e outros diásporos de plantas daninhas, o que reduz seu valor comercial, assim como o parasitismo às plantas de interesse econômico, como a relação de parasitismo de *Cuscuta* spp. e plantas cítricas (PITELLI; PITELLI, 2004).

As plantas daninhas também podem interferir na cultura de maneira indireta. Muitas das espécies são hospedeiros alternativos de diversas doenças importantes à lavoura infestada. Um exemplo é a necessidade de *Puccinia graminis* f. sp. *graminis* Pers. Se desenvolver num hospedeiro alternativo (*Berberis vulgaris* L. – daninha) para o estabelecimento da doença via ciclo sexuado na cultura do trigo (MORTIMER, 1990). A presença de plantas daninhas, hospedeiras de certas pragas e doenças, pode impedir que a rotação de cultura, muitas vezes uma das poucas escolhas do produtor para o controle desse problema, seja eficiente, inviabilizando o cultivo e, assim, prejudicando a economia local. Um exemplo é o controle de nematoides polífagos como os dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus*, cujas taxas de reprodução em algumas espécies daninhas, como *Sonchus oleraceus* L. e poáceas, respectivamente, podem ser superiores às taxas encontradas em cultivos. Podem ainda interferir nos tratamentos culturais e colheita da cultura, contribuir para a eutrofização de lagos e represas de abastecimento público ou de propriedades rurais e prejudicar programas de prevenção de moléstias epidêmicas por abrigarem animais vetores de vírus e protozoários (PITELLI; PITELLI, 2004).

Na tentativa de solucionar ou minimizar o incômodo da presença de plantas daninhas nas áreas agricultáveis e zonas urbanas, a sociedade passou a fazer uso de compostos químicos tóxicos para controlá-las. Na maior parte do mundo, os herbicidas representam a principal ferramenta no manejo desses vegetais. Essas substâncias químicas representaram, no

momento inicial de sua utilização, na chamada Revolução Verde, uma alternativa rápida, prática e econômica de manejo de plantas daninhas frente à gigantesca necessidade por produtos de origem agrícola, devido à explosão demográfica a partir da Revolução Industrial e agravada durante as Guerras Mundiais (PARAYIL, 2002).

No entanto, a sociedade tem se mostrado pouco satisfeita com as consequências do uso desse tipo de substâncias na produção agrícola, em virtude de uma série de problemas envolvidos em sua utilização (FALCONER, 1998). Um dos principais entraves na discussão sobre a validade da utilização de agrotóxicos em propriedades rurais é a segurança da família rural. Os casos de intoxicação têm aumentado, principalmente de maneira indireta. Embora o maior foco de risco na utilização desses compostos seja o momento da aplicação, que está diretamente relacionado às condições ambientais e aparatos de segurança utilizados, a intoxicação indireta tem se mostrado importante e de difícil predição (MATUO et al., 2001). O uso de fontes de água contaminada, superficiais e subterrâneas, e a ingestão de alimentos frescos que exijam o mínimo de cozimento são importantes fontes de substâncias que causam a intoxicação crônica ou aguda da população. Em virtude de sua atividade, a família rural tende a ser a primeira esfera da sociedade atingida pelos resíduos de agrotóxicos (OMS, 1992).

Com o advento da Agricultura Orgânica, resposta do setor agrícola ao descontentamento da sociedade a respeito do uso de substâncias tóxicas, surgiu a necessidade de encontrar novas maneiras e métodos, ditos alternativos, de manejo dos agentes danosos aos vegetais, entre eles patógenos, pragas e plantas daninhas, assim como outras maneiras melhor alinhadas ao conceito de sustentabilidade, como a manutenção da fertilidade do solo. A origem da maior parte dos agrotóxicos produzidos atualmente é da transformação de derivados de petróleo, recurso não-renovável, de custo relativamente alto e de utilização questionável devido às consequências de sua transformação e aproveitamento (BERGIER; SALIS, 2011).

No intuito de encontrar maneiras e métodos que minimizem o impacto dos agrotóxicos à sociedade e ao ambiente, os esforços dos envolvidos no desenvolvimento da Agricultura Orgânica têm-se firmado na observação e procura de processos já existentes na natureza e cujo princípio seja o equilíbrio entre as populações, ao contrário do sistema convencional de produção agrícola, em que uma espécie deve se sobressair às outras a todo custo (CAMPBELL; ROSIN, 2011). Entre os fenômenos observados na natureza, encontra-se a alelopatia.

A alelopatia, termo cunhado pelo fisiologista austríaco Molisch em 1937, provém do grego *allelon* (mútuo) e *pathos* (prejuízos) e se referia a toda interação bioquímica benéfica ou maléfica entre plantas e microrganismos. Rice (1984) propôs que a alelopatia fosse definida como qualquer tipo de interação prejudicial ou benéfico, seja de forma direta ou indireta, de uma planta sobre outra, pela liberação de compostos químicos no meio. Para Whittaker e Feeny (1971), a alelopatia é o conjunto de interações mediado pelos compostos químicos denominados aleloquímicos, com os quais os organismos de uma espécie afetam o crescimento, estado sanitário, comportamento ou a biologia da população de organismos de uma outra espécie, excluindo substâncias usadas apenas na alimentação da segunda espécie. O principal critério de diferenciação entre competição e alelopatia é o fato de que na competição há a retirada de algum fator de crescimento do meio, enquanto na alelopatia há a incorporação de um fator no meio (LINS, 2008).

Putnam e Tang, em 1974, foram os primeiros a explorar a possibilidade de utilização de culturas alelopáticas para suprimir o crescimento de plantas daninhas em regiões agrícolas, incluindo o desenvolvimento de culturas supressoras dessas espécies na rotação de cultura (WESTON, 1996). Os resíduos vegetais que formam a cobertura morta nos sistemas agrícolas têm fundamental importância na liberação de substâncias de caráter alelopático, que contribuem para o controle das populações invasoras, de forma eficiente; porém, muitas vezes desprezada (TOKURA; NÓBREGA, 2006). Em função dessa característica, os sistemas de rotação de cultura devem ser estudados a fim de evitar que combinações errôneas de espécies sensíveis e alelopáticas sejam implantadas, o que prejudicaria drasticamente a produção.

Atualmente, os estudos de alelopatia procuram isolar e identificar o aleloquímico responsável pelo fenômeno. De maneira geral, é conhecido que a maioria dos aleloquímicos é oriunda de metabólitos secundários, em especial as vias que envolvem o ácido shiquímico e o acetato, os quais são produzidos para fins específicos e segundo as leis da genética (LINS, 2008).

A pesquisa em alelopatia é, muitas vezes, norteadada pela busca de novos grupos químicos capazes de agir sobre novos sítios de ação, a fim de substituir os atuais herbicidas que geraram espécies espontâneas resistentes. Diversas vezes, a escolha, por não utilizar diretamente os compostos derivados de vegetais no manejo de plantas daninhas, se deve ao fato desses compostos serem, em sua grande maioria, solúveis em água, o que lhes confere rápida perda por lixiviação, ocasionando baixo efeito residual no solo, desfavorecendo o controle do alvo. As características relacionadas à baixa permanência dos compostos

aleloquímicos no solo são geralmente desejáveis na Agricultura Orgânica, juntamente com a baixa toxicidade ambiental (BHOWMIK; INDERJIT, 2003).

Apesar do grande número de trabalhos realizados na determinação das substâncias envolvidas em processos alelopáticos, é de rara ocorrência aqueles destinados ao entendimento de sua atuação no meio ambiente, em especial no solo. Algumas características desses compostos precisam ser estudadas, como a mínima concentração, cujo efeito é satisfatório; tempo de efeito residual e estabilidade no solo; influência na microbiota do solo e processos físico-químicos desse sistema, entre outras inerentes ao uso de substâncias químicas no ambiente agrícola (BHOWMIK; INDERJIT, 2003).

Dentre as estratégias de determinação da real atividade de extratos vegetais com princípios aleloquímicos, encontram-se os biotestes em laboratório, cujo objetivo é alcançado sob condições controladas do meio. Os biotestes realizados em ambientes controlados permitem a exclusão de todas as fontes de interferência que poderiam mascarar a atividade dos compostos presentes, e possibilitam determinar a substância bioativa e a parte do vegetal que mais a concentra ou libera (INDERJIT; DAKSHINI, 1995).

Notavelmente, o bioteste mais utilizado, em virtude de sua execução rápida e simples é o teste de germinação de sementes. No entanto, o teste de germinação de sementes não deve ser único na avaliação da atividade alelopática de extratos vegetais, uma vez que muitas vezes, o resultado é influenciado pelo número de sementes em relação ao volume de extrato utilizado (WEIDENHAMER et al., 1987). Outro cuidado importante ao se utilizar a germinação de sementes como indicador dos efeitos dos aleloquímicos está vinculado ao número de variáveis analisadas. A simples determinação da germinabilidade das sementes não é suficiente para determinar a influência do extrato testado sobre a planta alvo (FERREIRA; AQUILA, 2000). Outras variáveis que vêm sendo utilizadas para a avaliação de sementes podem ser prontamente utilizadas para a avaliação dos efeitos dos compostos de interesse, provenientes de plantas alelopáticas, como a velocidade de germinação, coeficiente de variação do tempo de germinação, sincronia da germinação e os tempos médio, inicial e final do processo (RANAL; SANTANA, 2006).

Outro importante bioteste utilizado para o mesmo fim é o crescimento de plântulas. Esse bioteste se mostra mais responsivo a uma ampla gama de aleloquímicos comumente encontrado no meio natural, como os compostos fenólicos. Entre os caracteres avaliados pelo bioteste com plântulas que fornecem dados com bom ajuste estatístico estão a massa seca, comprimento das partes área e radicular, contagem de danos às plântulas, como necrose de meristemas apicais radiculares e de parte aérea, determinação do teor de clorofila e

carboidratos (INDERJIT; DAKSHINI, 1995). No entanto, por ser de execução mais complexa e dispendiosa, poucos trabalhos têm abordado metodologias com esse enfoque avaliativo.

Os testes de germinação de sementes e crescimento de plântulas podem ser úteis para a determinação do espectro de ação dos extratos e compostos testados, sendo importantes no planejamento das demais etapas de investigação da capacidade prática de uso dos mesmos. Comumente, são utilizadas espécies com grande sensibilidade a alterações do meio, em especial no que se refere às substâncias presentes no substrato, entre elas o tomate (*Solanum lycopersicum* L.), o rabanete (*Raphanus sativus* L.) e, principalmente, a alface (*Lactuca sativa* L.) (ALVES et al., 2004; BRITO, 2010). O uso de espécies sensíveis é importante na detecção da presença, mesmo que mínima, de compostos nocivos ao desenvolvimento vegetal; porém, não possibilitam determinar o quão importante é essa influência, já que a maioria das espécies cultivadas ou espontâneas não é tão sensível quanto as espécies utilizadas na detecção de princípios aleloquímicos. Portanto, é importante o conhecimento dos grupos taxonômicos vegetais que possam sofrer maior influência do composto estudado, a fim de direcionar o desenvolvimento das investigações para o controle desses grupos em campo.

Ambos os testes citados possuem o mesmo inconveniente que têm se tornado um entrave à utilização, em campo, dos dados obtidos em laboratório. Os testes de germinação de sementes e crescimento de plântulas são geralmente realizados tendo como substrato papel toalha do tipo Germitest, filtro ou mata-borrão. Esse substrato, não disponível na natureza, não permite que outras relações bióticas e abióticas possam ser testadas concomitantemente. O substrato ideal para ensaios com alelopátia é, sem dúvida, o solo. Nele, são encontradas condições únicas de retenção dos compostos e atividade microbiana, assim como ocorre no ambiente. Diversos trabalhos a respeito do tema sugerem a importância dos testes feitos com o solo, seja ele esterilizado, quando se deseja conhecer o potencial de retenção dos compostos bioativos nos colóides, ou não esterilizado, quando o objetivo é determinar a permanência no solo sob a ação dos microrganismos e da fase abiótica do solo (INDERJIT; DAKSHINI, 1995, BOLLAG et al., 2002, BERMÚDEZ-SALDAÑA et al. , 2006, INDERJIT, 2006).

Uma vez tendo sido comprovada a existência de efeito alelopático por meio do estudo do comportamento *ex situ* do extrato, bem como do seu espectro de ação, no que se refere aos grupos taxonômicas com provável suscetibilidade, os próximos passos na investigação da praticidade do uso do extrato estudado se referem à determinação do comportamento em ambientes naturais ou relativamente próximos das condições de campo, como os testes em casa de vegetação. Entre as interações importantes no entendimento da dinâmica do composto

no solo, estão a interação das substâncias presentes no extrato, junto aos colóides do solo, e a interação entre essas substâncias e os microrganismos do solo.

Entre os inúmeros vegetais cujo potencial alelopático poderia ser confirmado, segundo os princípios citados, está *Leucaena leucocephala* (Lambert) de Wit., Fabaceae da subfamília Mimosoideae; de porte médio, podendo alcançar 20 metros de altura. Seu centro de origem é o sudeste do México e América Central. Adaptou-se bem às latitudes entre 30°N e 30°S. É uma árvore com múltiplos potenciais de exploração, entre eles o reflorestamento de áreas degradadas e a produção de forragem; neste último, caso com restrições a alguns animais, por conter substâncias tóxicas (PIRES et al., 2001). Estudos elucidaram que o extrato aquoso das folhas da leucena apresenta fitotoxicidade sobre várias plantas e que os aleloquímicos envolvidos nesse efeito são a L-mimosina, a quercetina, o ácido gálico e os ácidos protocatéquico, p-hidroxibenzóico, p-hidroxifenilacético, vanílico, ferúlico, caféico e p-cumárico (CHOU; KUO, 1986).

A L-mimosina, designada como  $\beta$ -(3-hidróxi-4-piridon-1-il)-L-alanina, é um aminoácido não peptídico, comumente encontrado no gênero *Leucaena* e na espécie *Mimosa pudica* L. Os aminoácidos não peptídicos produzidos por plantas, como a L-mimosina, são geralmente acumulados em altas concentrações nos tecidos vegetais (BELL, 1976). Sua ação em células de outros organismos é anti-mitótica, bloqueando o ciclo celular no final da fase G1 e inibindo a síntese de DNA, por evitar a formação da forquilha de replicação, devido à alteração do metabolismo dos desoxirribonucleotídeos (PANDEY; DWIVEDI, 2006). Todo o potencial de ação desse composto é dado por sua característica quelante, capturando cátions livres nas células ou ligando-se aos sítios ativos de enzimas que apresentem ferro ou cobre em sua estrutura (CHRUSCINSKA et al., 1999). Poucos seres conseguem degradar de forma direta a L-mimosina, entre eles, as espécies de *Rhizobium* que habitam as raízes de *Leucaena*, hemípteros da família Psyllidae e um isolado de *Pseudomonas putida* Trevisan (PANDEY; DWIVEDI, 2006).

Em estudos realizados na Ásia com 19 espécies, entre árvores, arbustos e plantas daninhas, *Leucaena glauca* Benth., que também sintetiza L-mimosina, foi a mais agressiva dentre as espécies alelopáticas testadas na germinação de *Raphanus sativus* (HONG et al., 2003). Observou-se que mimosina inibiu o crescimento de plântulas de *Phaseolus aureus* (Roxb.) Makawa (SMITH; FOWDEN, 1966); mimosina e extratos aquosos de folhas de leucena inibiram o crescimento da radícula de *Lactuca sativa* e *Oryza sativa* L. (KUO et al., 1982). Tawata e Hongo (1987) relatam que o crescimento de radícula de *Oryza sativa*, *Raphanus sativus*, *Brassica rapa* L. e *Phaseolus vulgaris* L. foi estimulado pela mimosina a

uma concentração igual ou menor que 1 µg mL<sup>-1</sup>. Entretanto, em *Daucus carota* L. e *Bidens pilosa* L., o crescimento da radícula foi inibido pela mimosina em concentrações iguais ou inferiores a 10 µg mL<sup>-1</sup> e à concentração de 100 µg mL<sup>-1</sup> a mimosina inibiu completamente o crescimento do sistema radicular dessas espécies. Estudos realizados por Souza Filho et al. (1997) com o extrato aquoso da parte aérea da leucena mostraram que houve inibição da germinação e do comprimento da radícula de *Desmodium adscendens* (Sw.) DC., *Sida rhombifolia* L. e *Vernonia polyanthes* (Spreng.) Less., levando os autores a concluir que esses efeitos provavelmente estariam relacionados com a mimosina.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M.C.S.; FILHO, S.M.; INNECCO, R.; TORRES, S.B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.

BELL, E.A. 'Uncommon' amino acids in plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 29-35, 1976.

BERGIER, I.; SALIS, S. M. **Excedente ecossistêmico e renovabilidade dos sistemas de produção em áreas úmidas**. Corumbá, Embrapa Pantanal, 2011. 12p.

BERMÚDEZ-SALDAÑA, J.M.; ESCUDER-GILABERT, L.; MEDINA-HERNÁNDEZ, M.J.; VILLANUEVAS-CAMAÑAS, R.M.; SAGRADO, S. Chromatographic estimation of the soil-sorption coefficients of organic compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 2, 2006.

BHOWMIK, P.C.; INDERJIT. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. **Crop Protection**, Guildford, v.22, p.661-671, 2003.

BOLLAG, J. M.; STRYNAR, M.; AHN, M. Y.; DEC, J. Characterization of enzymatic and abiotic immobilization of xenobiotics in soil. **Developments in Soil Science**, v. 28, p. 289-299, 2002.

BRITO, I. C. A. **Alelopatia de espécies arbóreas da caatinga na germinação e vigor de sementes de feijão macaçar e de milho**. 2010, 54 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia, Área de Concentração em Sistemas Agrosilvipastoris no Semi-Árido) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, 2002.

CAMPBELL, H.; ROSIN, C. After the 'Organic Industrial Complex': an ontological expedition through commercial organic agriculture in New Zealand. **Journal of Rural Sciences**, New York, v. 27, p. 350-361, 2011.

CHOU, C.H. The role of allelopathy in subtropical agroecosystem in Taiwan. In: PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. (Eds.). **The science of allelopathy**. New York : J. Wiley, 1986. p.57-73.

CHOU, C.H.; KUO Y.L. Allelopathic research of subtropical vegetation in Taiwan: III. Allelopathic exclusion of understory by *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Journal of Chemical Ecology**, New York v.12, p.1431-1448, 1986.

CHRUSCINSKA, E.; GARRIBBA, E.; MICERA, G.; PANZANELLI, A. L-Mimosine, an amino acid with maltol-type binding properties toward copper(II), oxovanadium(IV) and other metal ions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 75, p. 225-232, 1999.

ESPINOSA-GARCÍA, F. J.; SARUKHÁN, J. **Manual de malezas del Valle de México: claves, descripciones e ilustraciones**. 1 ed. Universidad Nacional Autónoma de México/Fondo de Cultura Económica: México, D. F., 1997. 407p.

FALCONER, K. E. Managing diffuse environmental contamination from agricultural pesticides: An economic perspective on issues and policy options, with particular reference to Europe. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, New York, v. 69, p. 37-54, 1998.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente na ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, n.12, p.175-205, 2000.

HARPER, J.L. **Population biology of plants**. London: Academic Press, 1977. 892p.

HONG, N.H.; XUAN, T.D.; EIJI, T.; HIROYUKI, T.; MITSUHIRO, M.; KHANH, T.D. Screening for allelopathic potential of higher plants from Southeast Asia. **Crop Protection**, Guildford, v. 22, p. 829-836, 2003.

INDERJIT. Experimental complexities in evaluating the allelopathic activities in laboratory bioassays: A case study. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 256-262, 2006.

INDERJIT; DAKISHINI, K.M.M. On laboratory bioassays in allelopathy. **The Botanical Review**, New York, v. 61, n. 1, p. 28-44, 1995.

KUO, Y.L.; CHOU, C.H.; HU, T.W. Allelopathic potencial of *Leucaena leucocephala*. **Leucaena Research Report**, Taipei, v.3, p.65-70, 1982.

LINS, P.L.C.A. Perspectivas da Utilização de Aleloquímicos no Manejo de Plantas Daninhas. In: PALTRONIERI, L.S.; ISHIDA, A.K.N. **Métodos Alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas: panorama atual e perspectivas na agricultura**. 1ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 308p.

MATUO, T.; PIO, L. C.; RAMOS, H. H.; FERREIRA, L. R.; Tecnologia de Aplicação e Equipamentos. In: **ABEAS – Curso de proteção de plantas. Módulo 2.** Brasília, D. F., ABEAS; Viçosa, UFV, 2001. 85p.

MORTIMER, A.M. The biology of weeds. In: HANCE, R.J.; HOLLY, K. **Weed control handbook: principles.** 8ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1990.

OMS. **Consecuencias sanitarias del empleo de plaguicidas en la agricultura.** Genebra: Organização Mundial da Saúde, 1992. 128p.

PANDEY, A.K.; DWIVEDI, U.N. Induction, isolation and purification of mimosine degradation enzyme from newly isolated *Pseudomonas putida* STM 905. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, p. 1059-1066, 2006.

PARAYIL, G. Mapping technological trajectories of the Green Revolution and the Gene Revolution from modernization to globalization. **Research Policy**, New York, v. 32, p. 971-990, 2002.

PIRES, N.M.; PRATES, H.T.; PEREIRA-FILHO, I.A.; OLIVEIRA-JR, R.S.; FARIA, T.C.L. Atividade alelopática da leucena sobre espécies de plantas daninhas. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 61-65, 2001.

PITELLI, R.A.; PITELLI, R.L.C.M. Biologia e Ecofisiologia das Plantas Daninhas. In: VARGAS, L.; ROMAN, E.S.. **Manual de Manejo e Controle de Plantas Daninhas.** 1ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process?. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.29, n.1, p.1-11, jan-mar., 2006.

RICE, E.L. **Allelopathy.** 2ed. Orlando: Academic Press, 1984. 422p.

SMITH, I.K.; FOWDEN, L. A study of mimosine toxicity in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 17, p. 750-761, 1966.

SOUZA FILHO, A.P.; RODRIGUES, R.A.; RODRIGUES, T.J.D. Efeitos do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília D.F., v.32, n.2, p.165-170, fev. 1997.

TAWATA, S.; HONGO, F. Mimosine allelopathy of *Leucaena leucocephala*. **Leucaena Research Report**, v. 6, p. 479-501, 1987.

TOKURA, L.K.; NÓBREGA, L.H.P. Alelopatia de cultivos de cobertura vegetal sobre plantas infestantes. **Acta Scientia Agronomica**, Maringá, v.28, n. 3, p.379-384, 2006.

WEIDENHAMER, J.D.; MORTON, T.C.; ROMEO, J.T. Solution volume and seed number: often overlooked factors in allelopathic bioassays. **Journal of Chemical Ecology**, New York, n.13, p. 1481-1491, 1987.

WESTON, L.A. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. **Agronomy Journal**, Madison, v.88, p.860-866, 1996.

WHITAKER, R.H. The chemical ecology of higher plants. In: SONDHEIMER, S.E.; SIMEONE, J.B. **Chemical Ecology**. New York: Academic Press, 1970.

WHITAKER, R.H.; FEENY, P.P. Allelochimics: Chemical interactions between species. **Science**, Washington D.C., v.171, p.757-770, 1991.

## **CAPÍTULO I**

**L-MIMOSINA NA EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS DE TOMATEIRO  
ORIUNDAS DE SEMENTES CONTAMINADAS POR *Pythium* SP**

**RESUMO** - O impacto negativo do setor agrícola moderno na saúde humana estimulou a busca por novas maneiras e métodos, ditos alternativos, de manejo dos agentes danosos aos vegetais, entre eles os fungos. Entre os diversos compostos oriundos do metabolismo secundário de plantas, úteis a este fim, encontra-se a L-mimosina, produzida por *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, utilizada nesse trabalho a fim de controlar tombamento. Este trabalho foi conduzido utilizando-se sementes de tomateiro, variedade Santa Cruz Kada, contaminadas com *Pythium* sp. Os tratamentos consistiram de concentrações de extrato com 3,1838; 6,3676; 9,5514 e 12,7352 mg de L-mimosina por grama de sementes em teste e o tratamento controle com água, cada um deles contando com quatro repetições de 25 sementes semeadas em vermiculita. Foram avaliadas a porcentagem de emergência, os tempos inicial, médio e final de emergência, coeficiente de variação do tempo, velocidade média e a sincronia da emergência, assim como a porcentagem de tombamento. A L-mimosina foi capaz de reduzir a incidência de tombamento de 81,8% para 26,6% das plântulas, bem como permitiu menor dispersão da emergência no tempo, por prejudicar sua colonização por *Pythium* sp.

Palavras-Chave: alelopatia, *Leucaena leucocephala*, *Solanum lycopersicum*

**ABSTRACT** - The negative impact of modern agriculture on human health has stimulated the search for new ways and methods, the so-called alternative management agents which are harmful to plants, among them fungi. Among the various compounds from plant secondary metabolites useful for this purpose is L-mimosine, produced by *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, used in this study to control damping-off. This study was conducted using tomato seeds, cultivar Santa Cruz Kada, contaminated with *Pythium* sp. The treatments consisted of 0.1838 mg, 6.3676 mg, 9.5514 mg and 12,7352 mg of L-mimosine per gram of tested seeds, with four replicates of 25 seeds, which were sown in vermiculite. Percentage of emergence, initial, mean, and final emergence time, coefficient of variation of the germination time, mean rate and synchrony were evaluated. L-mimosine was able to reduce the damping-off incidence from 81.8% to 26.6%, as well as it allowed lower emergence dispersion along the time, by decreasing *Pythium* sp. colonization.

Keywords: allelopathy, *Leucaena leucocephala*, *Solanum lycopersicum*

## INTRODUÇÃO

No intuito de encontrar maneiras e métodos de minimizar o impacto dos agrotóxicos à sociedade e ao ambiente, os esforços dos envolvidos no desenvolvimento da agricultura orgânica têm-se firmado na observação e procura de processos já existentes na natureza, pois estes têm como princípio o equilíbrio entre as populações. Ao contrário, nos sistemas convencionais de produção agrícola uma espécie deve se sobressair às outras a todo custo. Dentre os fenômenos observados na natureza, a alelopatia apresenta-se como importante processo de supressão da competição entre plantas e microrganismos, função semelhante à de agrotóxicos utilizados na agricultura moderna. No entanto, seu estudo *in situ* é dificultado devido às diversas interações existentes nos ecossistemas. Dentre as estratégias de determinação da real atividade de princípios aleloquímicos, encontram-se os biotestes em laboratório, realizados em ambientes controlados que permitem a exclusão de fontes de interferência que poderiam mascarar a atividade dos compostos, e possibilitam determinar a substância bioativa e a parte do vegetal que mais a concentra ou libera (INDERJIT; DAKSHINI, 1995).

Notavelmente, os biotestes mais utilizados, em virtude de sua execução rápida e simples, são os testes de germinação de sementes e emergência de plântulas. No entanto, alguns autores relatam que esse tipo de ensaio não deve ser a única forma de avaliação da atividade alelopática de extratos vegetais, uma vez que o resultado é influenciado pelo número de sementes em teste, em relação ao volume de extrato utilizado (WEIDENHAMER et al., 1987). Outro cuidado importante ao se utilizar a germinação de sementes ou emergência de plântulas como indicadores dos efeitos alelopáticos está vinculado ao número de variáveis analisadas, sendo recomendável que não se restrinja à porcentagem de germinação ou emergência (FERREIRA; AQUILA, 2000; SANTANA et al., 2006; GRISI, 2010).

O gênero *Pythium* compreende oomicetos cosmopolitas, habitantes do solo e que causam, entre outras doenças, tombamento ou *damping-off* de plântulas de diversas culturas, entre elas o tomateiro. Quando atacam as sementes de tomateiro, promovem sua rápida decomposição, não chegando a ocorrer sua germinação. Em tecidos vegetais jovens, ocasionam o aparecimento de manchas encharcadas devido à degradação por enzimas pectolíticas da lamela média, ocasionando o colapso do tecido. O controle desses patógenos se faz mediante a utilização de sementes livres do patógeno e tratadas com fungicida ou organismos antagônicos, assim como o tratamento do solo com fungicidas e a rotação de culturas, mesmo que esta seja dificultada pela ampla gama de hospedeiros (SILVA, 2008).

O presente trabalho teve como objetivo determinar, utilizando variáveis da emergência, a possibilidade da utilização de L-mimosina, presente em extratos de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, no controle de tombamento de tomateiro ocasionado por *Pythium* sp.

## MATERIAL E MÉTODOS

As folhas de *Leucaena leucocephala* foram coletadas no Parque Linear do Córrego do Óleo, na zona urbana de Uberlândia, Minas Gerais, no mês de fevereiro de 2012. O material foi coletado de 10 plantas distintas localizadas às margens do córrego que corta o referido Parque. As folhas foram destacadas dos ramos e secas em temperatura ambiente em local sombreado. Após a secagem, o material foi triturado em moinho de facas e acondicionado em recipiente de plástico revestido com papel-alumínio e mantido a 8°C até sua utilização.

Pó de folhas secas de leucena foi fervido em água por 5 minutos, na proporção de 100 g de folhas secas para 1 L de água destilada e a solução obtida foi filtrada a vácuo, em papel de filtro qualitativo Whatman n° 5. Esta solução filtrada foi levada à fervura a fim de reduzir seu volume à metade e assim pôde ser utilizada no preparo das concentrações correspondentes aos tratamentos. A concentração de L-mimosina no extrato aplicado foi determinada utilizando-se três amostras dos extratos, segundo método adaptado de Matsumoto e Sherman (1951). Para isto, 20 mL de cada amostra foram fervidos com 30 mg de carvão ativado por 15 minutos. Após fervura, estas foram filtradas. Em frascos de 15 mL foram adicionados 4 mL de solução de cloreto férrico a 0,5% em HCl 0,1 M; 1 mL da solução oriunda de cada amostra e 5 mL de solução de HCl 0,1 M. O complexo formado com a mistura foi levado a um espectrofotômetro de UV/VIS Hitachi 2000 com comprimento de onda regulado em 535 nm para leitura de sua absorbância. A concentração de L-mimosina foi obtida pela expressão matemática ,onde y: concentração de L-mimosina em mg L<sup>-1</sup>; vf: volume da amostra após fervura; aam: absorbância da amostra a 535 nm; ab: absorbância do branco.

Os tratamentos consistiram de quatro concentrações, incluindo 3,1838; 6,3676; 9,5514 e 12,7352 mg de L-mimosina por grama de sementes em teste e o controle com água destilada. A massa de sementes considerada para a determinação das concentrações foi a obtida por secagem a 70 °C até massa constante de 8 amostras de 100 sementes cada, que correspondeu a 0,1731 g ± 0,0001 g por 100 sementes.

O teste de emergência foi conduzido com sementes de tomateiro, variedade Santa Cruz Kada, semeadas em vermiculita expandida super fina (volume de expansão de 0,1 m<sup>3</sup>), em caixas do tipo gerbox, mantendo-se a umidade a 70% de sua capacidade de campo. O experimento foi instalado em câmara de germinação e desenvolvimento (Seedburo Equipment Company, modelo MPG – 2000), sob luz branca fluorescente contínua ( $7,834 \pm 4,709 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), entre 25 e 27 °C, delineamento inteiramente casualizado (DIC), composto de quatro concentrações e uma testemunha, cada uma com quatro repetições de 25 sementes cada. As leituras foram feitas em intervalos de 12 horas. Sempre que necessário foi adicionada água destilada para manter a vermiculita a 10% da capacidade de campo.

O lote de sementes foi adquirido infestado pelo patógeno, detectado por um pré-teste de emergência, utilizando-se 100 sementes do lote. Após o aparecimento dos sintomas da doença e dos sinais do patógeno (hifas), estes foram levados ao microscópio estereoscópio. A identificação do fungo se fez em microscópio de luz pela observação e comparação de hifas tingidas pelo corante Azul de Algodão, com guias de identificação.

Foram avaliados a porcentagem de emergência ( $E$ ); os tempos inicial ( $t_0$ ), médio ( $\bar{t}$ ) e final ( $t_f$ ); a velocidade média ( $\bar{v}$ ); o coeficiente de variação do tempo ( $CVt$ ) e a sincronia ( $Z$ ) do processo de emergência, conforme sugerido por Ranal e Santana (2006). O critério utilizado para considerar uma plântula emergida foi o aparecimento da alça hipocotiledonar acima do nível do substrato. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando os dados se mostraram estatisticamente significantes pelo teste de  $F$  a 0,05 de significância, estes foram submetidos à regressão linear, quadrática e cúbica, a fim de encontrar o melhor modelo ajustado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para todas as variáveis do processo de emergência, cuja regressão foi possível, o resultado menos satisfatório foi obtido na ausência de L-mimosina (Figura 1). A maior porcentagem de tombamento ocorreu no controle, com incidência de 81,8% (obtida como valor complementar à porcentagem de emergência), bem como a menor incidência da doença ocorreu na maior dose, 26,6%. Os dados obtidos para a porcentagem de emergência ( $E$ ) na dose mais alta (12,7352 mg g<sup>-1</sup> de L-mimosina por grama de semente em teste) foram semelhantes aos obtidos por Patrício et al. (2007) quando estes trataram o solo, no qual se fez a semeadura de pepino, com isolado de *Trichoderma* sp. ou quando o solo fora anteriormente submetido à solarização. Bettiol et al. (1997) relatam diminuição da incidência de

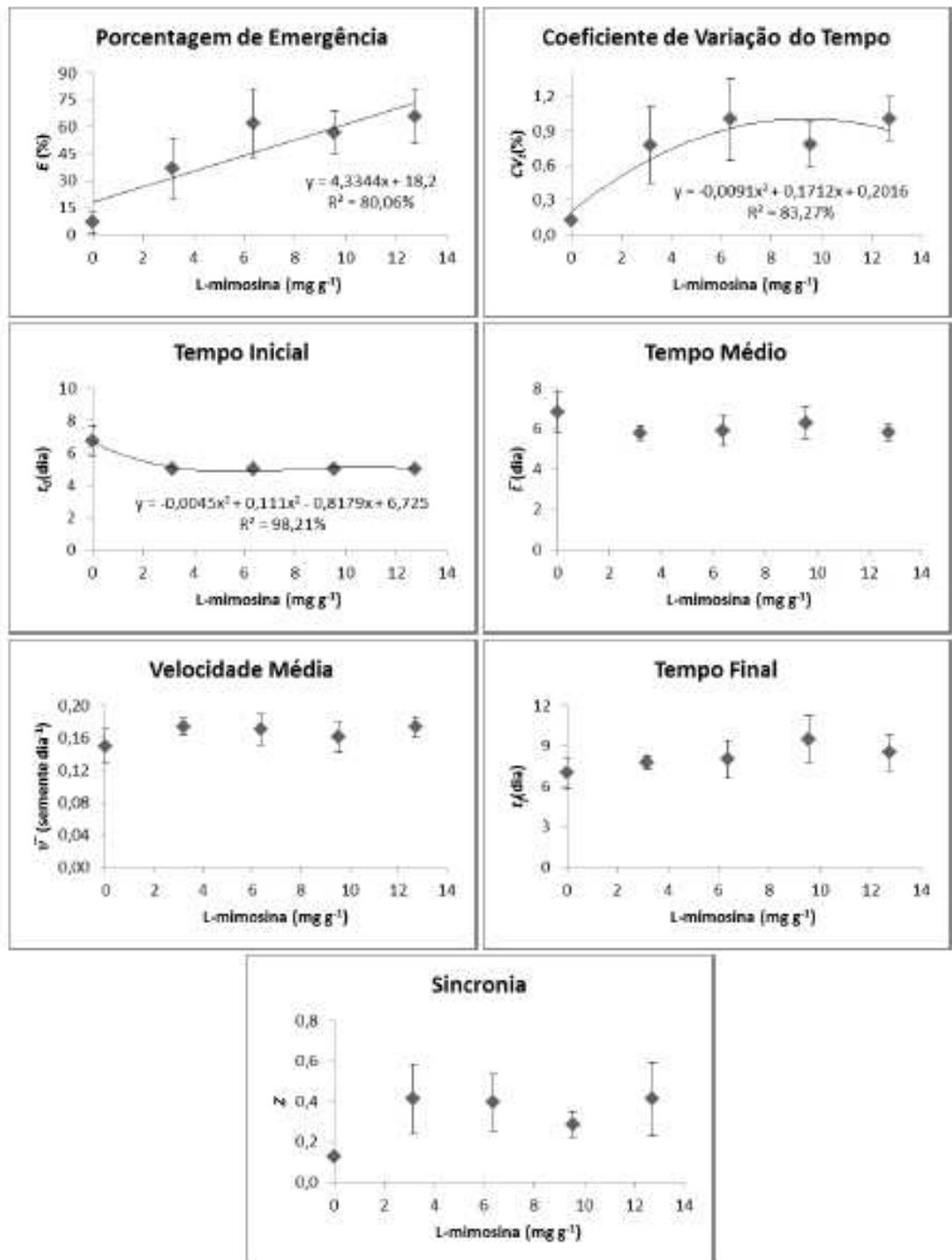


Figura 1: Variáveis do processo de emergência de plântulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) contaminadas por *Pythium* sp. submetidas a diferentes concentrações de L-mimosina. Gráficos sem linha de regressão indicam que a mesma não foi significativa ( $R^2 < 70\%$  à probabilidade de 0,05 pelo teste de  $F$ ).

tombamento em pepino, causado por *Pythium* sp., com a adição de matéria orgânica ao solo, em valores também semelhantes aos obtidos neste trabalho. O controle efetivo deste patógeno é relatado apenas com a utilização de fungicidas, em ambos os trabalhos.

No entanto, o simples fato das plântulas emergirem não garante que as mudas serão vigorosas e que responderão a um cronograma de produção. A diminuição do tempo inicial de emergência indica melhor estado fisiológico e sanitário das plântulas, visto que o agente causal da doença foi prejudicado, ao menos temporariamente. Neste sentido, medidas de emergência tais como o tempo inicial e a sincronia podem evidenciar o melhor estado fisiológico dessas plântulas e, por conseguinte, o melhor estado sanitário das mesmas.

O coeficiente de variação do tempo é uma medida de dispersão que permite comparações, independentemente da magnitude do tempo médio de emergência (RANAL; SANTANA, 2006). Deste modo, é possível observar que com o aumento das concentrações de L-mimosina, a variação entre os tempos médios aumentou até a concentração de 9,4286 mg g<sup>-1</sup> e, a partir de então, passou a decair novamente. Em geral, em populações de plântulas cujo ambiente não lhes ofereça estresses significativos, a tendência é de que o coeficiente de variação do tempo de emergência seja baixo, como consequência da emergência menos dispersa no tempo, uma vez que a condição é favorável aos indivíduos. No entanto, populações sob alto estresse podem também apresentar menor dispersão no tempo, visto que já não contam com alternativas para resistir ao fator que limita seu desenvolvimento. O fato de serem capazes de dispersar sua emergência no tempo mostra uma melhora no estado fisiológico dessas plântulas, processo semelhante ao que ocorre em plantas daninhas, cujo controle que lhes é imposto seja moderado (MORTIMER, 1990).

Segundo Kalejta e Hamlin (1997), a L-mimosina é capaz de interferir de maneira significativa na taxa de alongamento das cadeias de ácidos nucleicos no momento da replicação do DNA e na transcrição de RNA, o que pode impedir ou dificultar a multiplicação de células e a produção de proteínas pelo organismo afetado. Seus efeitos são ocasionados por interferência nos períodos G1 e S do ciclo celular, o que dificulta sua continuação. Diversos estudos realizados com fungicidas inibidores de oomicetos para o controle de *Phytophthora* spp. e *Pythium* spp. demonstraram que o modo de ação dessa classe de substâncias envolve a inibição da síntese do RNA (FISCHER; HAYES, 1982; DAVIDSE et al., 1984). Logo, é possível concluir que o efeito de L-mimosina no comportamento de *Pythium* sp. seja decorrente de processo semelhante ao de produtos regularmente utilizados no mercado para seu controle.

De maneira geral, a utilização de L-mimosina mediante o uso de extratos de *Leucaena leucocephala* nas mais altas concentrações foi capaz de potencializar seu desempenho melhorar o estado sanitário das plântulas de tomateiro por prejudicar sua colonização por *Pythium* sp.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BETTIOL, W.; MIGHELI, Q.; GARIBALDI, A. Controle, com material orgânica, no tombamento de pepino, causado por *Pythium ultimum* Trow. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília D.F., v. 32, p. 57-61, 1997.

DAI, Y.; GOLD, B.; VISHWANATHA, J. K.; RHODE, S. L. Mimosine inhibits viral DNA synthesis through ribonucleotide reductase. **Virology**, New York, v. 205, p. 210-216, 1994.

DAVIDSE, L. C.; GERRITSMA, O. C. M.; VELTHUIS, G. C. M. A differential basis of antifungal activity of acylalanine fungicides and structurally related chloroacetanilide herbicides in *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 21, p. 301-308, 1984.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente na ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Paulo, v. 12, p. 175-205, 2000.

FISHER, D. J.; HAYES, A. L. 1982. Mode of action of the systemic fungicides furalaxyl, metalaxyl and ofurace. **Pesticide Science**, Oxford, v. 13, p. 330-339, 1982.

GRISI, P. A. **Potencial alelopático de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)**. São Carlos: UFSCAR. 128p. (Dissertação mestrado), 2010.

INDERJIT; DAKISHINI, K. M. M. On laboratory bioassays in allelopathy. **The Botanical Review**, New York, v. 61, p. 28-44, 1995.

KALEJTA, R. F; HAMLIN, J. L. The dual effect of mimosine on DNA replication. **Experimental Cell Research**, New York, v. 231, p. 173-183, 1997.

MATSUMOTO, H; SHERMAN, G. D. A rapid colorimetric method for the determination of mimosine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, p. 195-200, 1951.

MORTIMER AM. The biology of weeds. In: HANCE, R. J.; HOLLY, K. (eds.) **Weed control handbook: principles**. 8ed. London: Blackwell Scientific Publications. 582p. 1990.

OMS. **Consecuencias sanitarias del empleo de plaguicidas en la agricultura**. Ginebra: OMS, 128p. 1992.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, p. 1-11, 2006.

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

SILVA, M. M. **Caracterização da Interação de *Pythium* spp. Com plântulas de *Solanum lycopersicum***. 2008. 123f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

WEIDENHAMER, J. D.; MORTON, T. C.; ROMEO, J. T. Solution volume and seed number: often overlooked factors in allelopathic bioassays. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 13, p. 1481-1491, 1987.

## CAPÍTULO II

**L-MIMOSINA NA EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS DE FEDEGOSO (*Senna occidentalis* (L.) Link)**

**RESUMO** – O uso continuado de agrotóxicos e o impacto negativo dos resíduos desses produtos à saúde humana estimulou a busca por métodos alternativos de manejo de plantas daninhas. Dentre esses, destaca-se o uso de compostos do metabolismo secundário de plantas como a L-mimosina, produzida por *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. Este trabalho foi conduzido utilizando-se sementes de fedegoso (*Senna occidentalis* (L.) Link), daninha de difícil controle em áreas de pastagem. Os tratamentos consistiram de concentrações de extrato com 3,1838; 6,3676; 9,5514 e 12,7352 mg de L-mimosina por grama de sementes em teste, e o tratamento controle com água, cada um deles contando com quatro repetições de 25 sementes, semeadas em vermiculita. Foram avaliados a porcentagem de emergência, os tempos inicial, médio e final de emergência, coeficiente de variação do tempo, velocidade média e a sincronia da emergência. Houve redução da velocidade média e aumento do tempo médio do processo. De maneira geral, a utilização de L-mimosina não foi capaz de prejudicar o desempenho de plântulas de *Senna occidentalis*.

Palavras-Chave: alelopatia, *Leucaena leucocephala*, plantas daninhas

**ABSTRACT** - Continued use of pesticides and the negative impact of these products on human health has stimulated the search for alternative methods of weed management. Among these, the use of compounds of secondary metabolism of plants such as L-Mimosine produced by *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit contrasts. This study was conducted using sicklepod seeds (*Senna occidentalis* (L.) Link), weed of difficult control in pasture areas. The treatments consisted of 3.1838 mg, 6.3676 mg, 9.5514 mg e 12.7352 mg of L-mimosine per gram of tested seeds, with four replicates of 25 seeds. The seeds were sown in vermiculite, maintaining the moisture at 70% of the water retention capacity. Percentage of emergence, initial, mean, and final emergence time, coefficient of variation of the germination time, mean rate and synchrony were evaluated. There was reduction of the mean rate and increase of mean time of the process. In general, the use of L-mimosine was not able to reduce the performance of *Senna occidentalis* seedlings.

Keywords: allelopathy, *Leucaena leucocephala*, weeds

## INTRODUÇÃO

O estudo da alelopatia vem ganhando espaço na comunidade científica por trazer uma nova visão de controle de organismos indesejáveis pela utilização de processos já existentes na natureza. Esse tipo de processo é observado em biomas naturalmente equilibrados e pode ser uma alternativa à tentativa de equilibrar também os biomas artificiais, criados pela humanidade. Dentre os diversos compostos ditos alelopáticos estudados, encontra-se a L-mimosina, aminoácido não peptídico encontrado nos gêneros *Leucaena* e *Mimosa* (Fabaceae).

Aminoácidos não peptídicos, também ditos “incomuns”, são produto de modificações nas rotas comuns da formação dos principais aminoácidos conhecidos. Provavelmente, essas modificações nas rotas pré-existentes promovem a produção de metabólitos secundários capazes de proteger a planta de predadores, permitindo-lhe competir com outras plantas pelos recursos do ambiente, tais como luz, água, nutrientes, espaço, entre outros (BELL, 1976). Entre as famílias que mais apresentam espécies que acumulam esse tipo de composto está Fabaceae. Assim como as demais plantas da família, *Leucaena leucocephala* (Lambert) de Wit. apresenta grande quantidade de proteínas e aminoácidos livres em seus tecidos. Teores expressivos de compostos desta natureza em folhas de leucena foram relatados por Garcia et al. (1995) como a presença de 4,15% de nitrogênio, 29,2% de proteína bruta e 4,3% de L-mimosina, podendo esta chegar até 8%.

Nos últimos anos, diversas pesquisas buscam novas aplicações a compostos como a L-mimosina. Entre os novos usos pesquisados, encontra-se a utilização no controle de pragas e doenças de plantas (ISHAAYA et al., 1991; MITCHELL et al., 1993; HARTNEY et al., 2007 HUANG et al., 2011) bem como a utilização no controle de plantas daninhas. No entanto, é necessário que se conheça o efeito desses compostos sobre as plantas de interesse econômico, uma vez que em condições de produção, as plantas de interesse e os organismos indesejáveis estão presentes simultaneamente no mesmo espaço. Alternativas sustentáveis devem garantir o controle de organismos indesejáveis, mas também a manutenção das características desejadas da cultura em produção.

Como meio simples, rápido e controlável de observação do comportamento dos vegetais, os biotestes são importantes e necessários como ferramenta na determinação das respostas influenciadas pelas substâncias em questão. Entre os biotestes mais utilizados, encontra-se o teste de germinação de sementes. É importante que esse processo possa ser avaliado de diversas maneiras, seja a quantificação de sementes germinadas, bem como a distribuição dessa germinação no tempo. Para isso, a utilização de diversas variáveis que possam detectar as mais sutis variações nos padrões de germinação é de extrema importância,

haja visto que apenas a porcentagem de germinação não é capaz de englobar os fatores físicos e temporais envolvidos nesse processo (FERREIRA; AQUILA, 2000). Outras variáveis são a velocidade média de emergência, coeficiente de variação do tempo, sincronia e os tempos médio, inicial e final do processo (RANAL; SANTANA, 2006), úteis na determinação de variações no padrão de emergência, mesmo em espécies pouco responsivas às interferências químicas naturais ou de origem antrópica.

Entre as espécies de difícil controle está *Senna occidentalis* (L.) Link. Planta daninha, perene, frequente em campos nativos, pastagens e lavouras nos primeiros anos de implantação, de ocorrência bastante comum no Cerrado do Brasil Central. É planta arbustiva de controle dificultado pela intensa produção de sementes contidas em frutos deiscentes (KISSMANN; GROTH, 1999).

O presente trabalho teve como objetivo verificar a influência do extrato aquoso de folhas de leucena, rico em L-mimosina, sobre a emergência de plântulas de fedegoso, visto que essa pode ser uma alternativa para o controle dessa espécie daninha, cujas opções oferecidas pelo mercado são escassas.

## MATERIAL E MÉTODOS

As folhas de *Leucaena leucocephala* foram coletadas no Parque Linear do Córrego do Óleo, na zona urbana de Uberlândia, Minas Gerais, no mês de fevereiro de 2012. O material foi coletado de 10 plantas localizadas às margens do córrego que corta o referido Parque. As folhas foram destacadas dos ramos e secadas em temperatura ambiente em local sombreado. Após a secagem, o material foi triturado em moinho de facas e acondicionado em recipiente plástico revestido de papel-alumínio, tendo sido mantido a 8°C até sua utilização.

Pó de folhas secas de leucena foi fervido em água por 5 minutos, na proporção de 100 g de folhas secas para 1 L de água destilada e a solução obtida foi filtrada a vácuo, em papel de filtro qualitativo Whatman nº 5. Esta solução filtrada foi levada à fervura a fim de reduzir seu volume à metade e assim pôde ser utilizada no preparo das concentrações correspondentes aos tratamentos. A concentração de L-mimosina no extrato aplicado foi determinada utilizando-se três amostras dos extratos, segundo método adaptado de Matsumoto e Sherman (1951). Para isto, 20 mL de cada amostra foram fervidos com 30 mg de carvão ativado por 15 minutos. Após fervura, estas foram filtradas. Em frascos de 15 mL foram adicionados 4 mL de solução de cloreto férrico a 0,5% em HCl 0,1 M; 1 mL da solução oriunda de cada amostra e 5 mL de solução de HCl 0,1 M. O complexo formado com a mistura foi levado a um espectrofotômetro de UV/VIS Hitachi 2000 com comprimento de onda regulado em 535 nm

para leitura de sua absorvância. A concentração de L-mimosina foi obtida pela expressão matemática  $y = 2,252 \times \frac{v_f(a_{am} - a_b)}{20}$ , onde  $y$ : concentração de L-mimosina em  $\text{mg L}^{-1}$ ;  $v_f$ : volume da amostra após fervura;  $a_{am}$ : absorvância da amostra a 535 nm;  $a_b$ : absorvância do branco

Os tratamentos consistiram de quatro concentrações, incluindo 3,1838 mg, 6,3676 mg, 9,5514 mg e 12,7352 mg de L-mimosina por grama de sementes em teste e o controle com água destilada. A massa de sementes considerada para a determinação das concentrações foi a obtida por secagem a 70 °C até massa constante de 8 amostras de 100 sementes cada, que correspondeu a  $1,5748 \text{ g} \pm 0,0300 \text{ g}$  por 100 sementes.

O teste de emergência foi conduzido com sementes de fedegoso, escarificadas mecanicamente por picote lateral, semeadas em vermiculita expandida super fina (volume de expansão de 0,1 m<sup>3</sup>), em caixas do tipo gerbox, mantendo-se a umidade a 70% de sua capacidade de campo. O experimento foi instalado em câmara de germinação e desenvolvimento (Seedburo Equipment Company, modelo MPG – 2000), sob luz branca fluorescente contínua ( $7,834 \pm 4,709 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), entre 25 e 27 °C, delineamento inteiramente casualizado (DIC), composto de 4 concentrações e uma testemunha, cada uma com 4 repetições de 25 sementes cada. . As leituras foram feitas em intervalos de 12 horas. Sempre que necessário foi adicionada água destilada para manter a vermiculita a 10% da capacidade de campo.

Foram avaliados a porcentagem de emergência ( $E$ ); os tempos inicial ( ), médio ( $\bar{t}$ ) e final ( ); a velocidade média ( $\bar{v}$ ); o coeficiente de variação do tempo ( $CVt$ ) e a sincronia ( $Z$ ) do processo de emergência, conforme sugerido por Ranal e Santana (2006). O critério utilizado para considerar uma plântula emergida foi o aparecimento da alça hipocotiledonar acima do nível do substrato. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando os dados se mostraram estatisticamente significantes pelo teste de  $F$  a 0,05 de probabilidade, estes foram submetidos à regressão linear, quadrática e cúbica, a fim de encontrar o melhor modelo ajustado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a maioria das variáveis analisadas não houve resposta de *Senna occidentalis* aos tratamentos empregados, à exceção do tempo médio e velocidade média de emergência

(Figura 1). Resultado semelhante é relatado por Williams e Hoagland (2007) com outra espécie do mesmo gênero, *Senna obtusifolia* (L.) Irwin & Barneby. Os referidos autores relatam que o aumento do tempo de embebição das sementes dessa espécie em solução de L-mimosina não é capaz de potencializar a inibição da germinação sobre as mesmas. É importante destacar que a resposta a compostos com propriedades aleloquímicas ocorre com maior frequência no comprimento da radícula e parte aérea de plântulas (WILLIAMS; HOAGLAND, 1984; REIS et al., 1999), como relatado quando da utilização de  $\beta$ -(3-isoxazolin-5-on-2-il)-alanina, um aminoácido não peptídico encontrado em *Pisum sativum* L., cujas características se assemelham às da L-mimosina (SCHENK; WERNER, 1991). Isso talvez se explique pelo maior contato dessas substâncias com os tecidos do hipocótilo e raízes, uma vez que o substrato possui concentrações consideráveis do aleloquímico em questão.

O aumento do tempo médio e a diminuição da velocidade média de emergência podem conferir vantagem competitiva ao pasto ou cultivo implantado que, ao ocupar o espaço e garantir seu suprimento nos mais diversos recursos do meio mais rapidamente, impede o estabelecimento e desenvolvimento do fedegoso. No entanto, o controle químico de espécies perenes após seu estabelecimento não é recomendado, uma vez que estas são capazes de se recuperar por possuírem gemas subterrâneas, podendo constituir novo dossel (LORENZI, 2006).

Mesmo sendo pouco responsivo, fedegoso é uma espécie de interesse por apresentar características comuns às plantas daninhas, entre elas a alta variabilidade genética, que lhe confere distintos processos de defesa, com rusticidade que faz dessas plantas exímias competidoras por recursos escassos do meio. Ao contrário das plantas daninhas, as espécies geralmente utilizadas como indicadoras de atividade alelopática são cultivadas, sendo a maioria hortaliças que sofreram intenso processo de domesticação e melhoramento. A preferência pelas espécies cultivadas é motivada pela uniformidade genética, fisiológica e morfológica das plântulas, o que ocasiona reconhecimento mais fácil de mudanças sutis nos padrões de emergência dessas espécies. Além disso, espécies de amplo cultivo permitem que os resultados se repitam e sejam menos influenciados pelas condições, tanto de produção dessas sementes, quanto de condução dos ensaios. Entre as espécies mais utilizadas encontram-se *Daucus carota* L., *Zea mays* L., *Glycine max* (L.) Merrill, *Phaseolus vulgaris* L.,

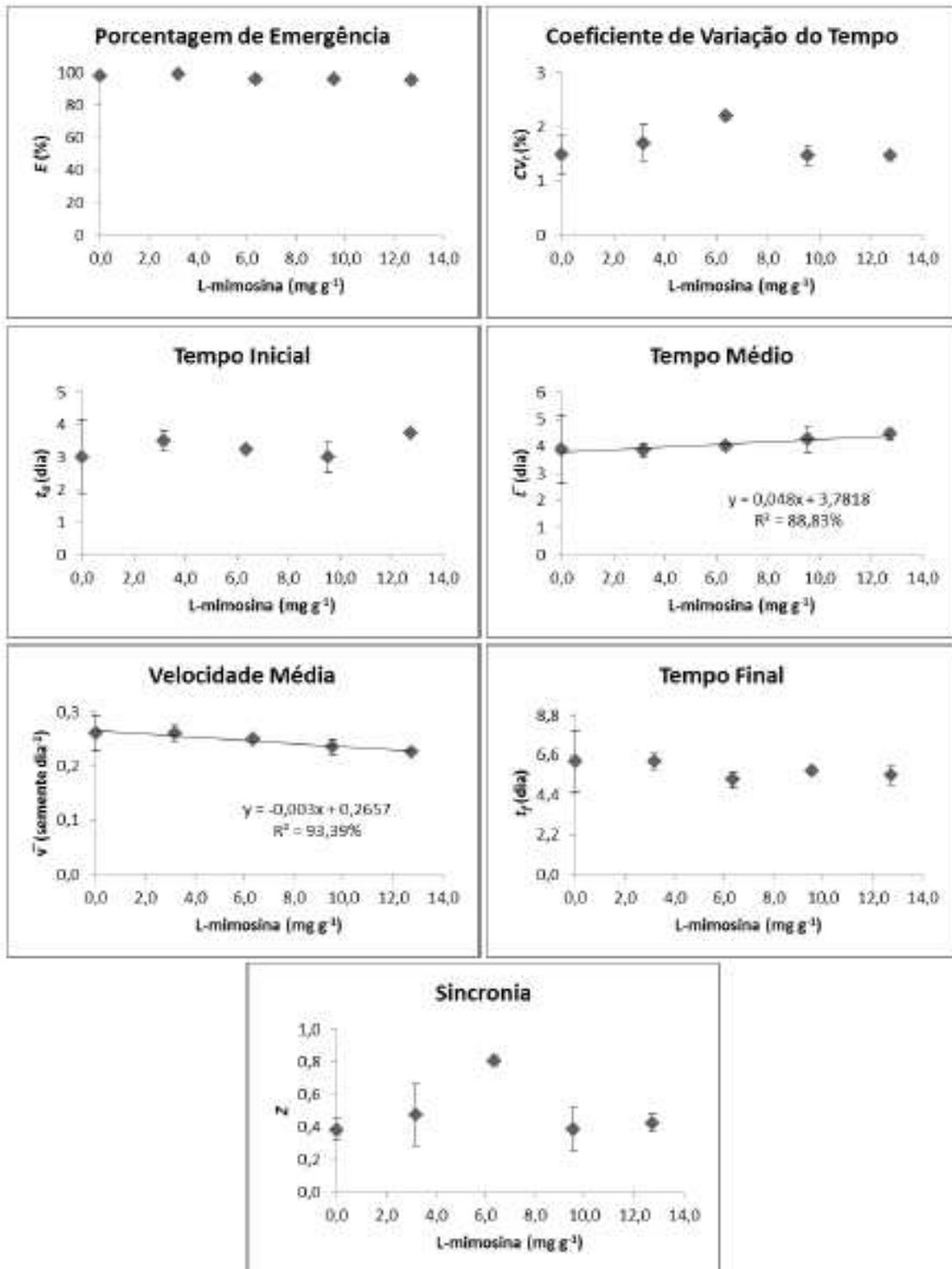


Figura 1: Variáveis do processo de emergência de plântulas de fedegoso (*Senna occidentalis* (L.) Link) submetidas a diferentes concentrações de L-mimosina, extraída de folhas de *Leucaena leucocephala* (Lambert) de Wit. Gráficos sem linha de regressão indicam que a mesma não foi significativa ( $R^2 < 70\%$  à significância de 0,05 pelo teste  $F$ ).

*Triticum aestivum* L. e as consideradas mais responsivas *Raphanus sativus* L., *Lactuca sativa* L. e *Solanum lycopersicum* L. (KOHLI et al., 1998). É importante salientar que o

intuito da busca por compostos alelopáticos para o controle de plantas daninhas deve ser guiado pela busca de efeitos nestas plantas. O estudo em plantas de interesse é sim importante, mas para a compreensão das implicações do uso dessas substâncias nos cultivos comerciais já estabelecidos e de importância ao produtor rural.

De maneira geral, a aplicação de extratos de leucena ricos em L-mimosina não proporcionou interferência negativa sobre o processo de emergência de plântulas de fedegoso, sendo esta substância, sob as condições de ensaio, ineficaz no controle da mesma.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELL, E. A. 'Uncommon' amino acids in plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 29-35, 1976.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente na ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, n. 12, p. 175-205, 2000.

GARCIA, J. W.; FERGUSON, T. U.; NECKLES, F. A.; ARCHIBALD, K. A. E. The nutritive value and forage productivity of *Leucaena leucocephala*. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 60, p. 29-41, 1996.

HARTNEY, S.; CARSON, J.; HADWIGER, L. A. The use of chemical genomics to detect functional systems affecting the non-host disease resistance of pea to *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. **Plant Science**, Limerick, v. 172, p. 45-56, 2007).

HUANG, T.; JANDER, G.; DE VOS, M. Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: Representative cases and opportunities for further functional analysis. **Phytochemistry**, New York, v. 72, p. 1531-1537, 2011.

ISHAAYA, I.; HIRASHIMA, A.; YABLONSKI, S.; TAWATA, S.; ETO, M. Mimosine, a Nonprotein Amino Acid, Inhibits Growth and Enzyme Systems in *Tribolium castaneum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 39, p. 35-42, 1991.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e Nocivas – tomo II**. São Paulo: BASF, 2 ed. 1999.

KOHLI, R. K.; BATISH, D.; SINGH, H. P. Allelopathy and its implications in Agroecosystems. **Journal of Crop Production**, Philadelphia, v. 1, p. 169-2001, 1998.

LORENZI, H. **Manual de Identificação e Controle de Plantas Daninhas: plantio direto e convencional**. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2006. 385p.

MATSUMOTO, H; SHERMAN, G. D. A rapid colorimetric method for the determination of mimosine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, p. 195-200, 1951.

MITCHELL, M. J.; KEOGH, D. P.; CROOKS, J. R.; SMITH, S. L. Effects of Plant Flavonoids and Other Allelochemicals on Insect Cytochrome P-450 Dependent Steroid Hydroxylase Activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 65-71, 1993.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process?. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.29, n. 1, p. 1-11, jan-mar., 2006.

REIS, P.J., SAHLU, T., AND GOETSCH, A.L. Effects of mimosine and 2,3-dihydroxypyridine on fiber shedding in Angora goats. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, p. 1487-1492, 1999.

SCHENK, S. U.; WERNER, D.  $\beta$ -(3-isoxazolin-5-on-2-il)-alanina from *Pisum*: allelopathic properties and antimycotic assay. **Phytochemistry**, New York, v. 30, n. 2, p. 467-470, 1991.

SOUZA FILHO, A.P.; RODRIGUES, R.A.;RODRIGUES, T.J.D. Efeitos do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília D.F., v. 32, n. 2, p.165-170, 1997.

WEIDENHAMER, J.D.; MORTON, T.C.; ROMEO, J.T. Solution volume and seed number:often overlooked factors in allelopathic bioassays. **Journal of Chemical Ecology**, New York, n. 13, p. 1481-1491, 1987.

WHITAKER, R.H.; FEENY, P.P. Allelochimics: Chemical interactions between species. **Science**, Washington D.C., v. 171, p. 757-770, 1991.

REIS, P.J., SAHLU, T., AND GOETSCH, A.L. Effects of mimosine and 2,3-dihydroxypyridine on fiber shedding in Angora goats. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, p. 1487-1492, 1999.

WILLIAMS, R.D.; HOAGLAND, R.E. The effects of naturally occurring compounds on seed germination. **Weed Science**, Champaign, v. 30, p. 206-212, 1984.

WILLIAMS. R. D; HOAGLAND, R. E. Phytotoxicity of mimosine and albizziine on seed germination and seedling growth of crops and weeds. **Allelopathy Journal**, Hisar, v. 19, n. 2, p. 423-430, 2007.

### **CAPÍTULO III**

#### **L-MIMOSINA NA EMERGÊNCIA E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

**RESUMO** – Diversos trabalhos apontam que o extrato de leucena, rico em L-mimosina, exerce grande influência nos organismos indesejáveis, o que justifica seu uso como agrotóxico objetivando o controle de pragas e doenças. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência de L-mimosina na emergência de plântulas de feijoeiro e nas características morfológicas das mesmas. Foram utilizadas sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Pérola. Os tratamentos consistiram de concentrações de extrato com 0,3184; 0,6368; 0,9551 e 1,2735 mg de L-mimosina por grama de sementes em teste, e o tratamento controle com água, cada um deles contando com quatro repetições de 25 sementes. Foram avaliadas a porcentagem de emergência, os tempos inicial, médio e final de emergência, coeficiente de variação do tempo, velocidade média e a sincronia da emergência. Foram ainda avaliadas características morfológicas das plântulas. De maneira geral, a utilização de L-mimosina não foi capaz de prejudicar o desempenho de plântulas de feijoeiro no processo de emergência. No entanto, induziu a morte de raízes primária e secundárias a níveis superiores a 60%, mesmo nas doses mais baixas, assim como o estiolamento dessas plântulas a níveis próximos de 100%, modificações que podem impedir o estabelecimento das mesmas no campo.

Palavras-Chave: alelopatia, anomalias em plântulas, feijoeiro, *Leucaena leucocephala*,

**ABSTRACT** - Several studies indicate that the extract of leucaena, rich in L-Mimosine, exerts great influence on the unwanted organisms, which justifies its use as pesticide aiming to control pests and diseases. This study aimed to evaluate the influence of L-Mimosine in the emergence of bean seedlings and morphological characteristics of the same. This study was conducted using *Phaseolus vulgaris* L. seeds cultivar Pérola. The treatments consisted of 0.3184, 0.6368, 0.9551 and 1.2735 mg of L-mimosine per gram of tested seeds, with four replicates of 25 seeds. Percentage of emergence, initial, mean, and final emergence time, coefficient of variation of the germination time, mean rate and synchrony were evaluated. In general, the use of L-Mimosine was not able to decrease the performance of bean seedlings. However, it induced the death of primary and secondary roots at levels up than 60% even in the lower concentrations, as well as their etiolament at near 100%, modifications that may prevent its establishment in the field.

Keywords: Allelopathy, dry bean, *Leucaena leucocephala*, seedling anomalies

## INTRODUÇÃO

Os processos naturais de supressão da competição existentes em ambientes não alterados pelo homem vêm despertando a curiosidade e o interesse do ramo agrícola, por alternativas mais sustentáveis e menos dependentes dos grandes conglomerados industriais, responsáveis pela produção dos agrotóxicos. A busca por um pacote tecnológico que esteja acessível ao produtor, ao mesmo tempo em que reduz seus gastos e sua dependência de insumos externos faz da alelopatia um processo interessante. Entre as substâncias passíveis de utilização para esse fim estão os aminoácidos não peptídicos, como a L-mimosina.

Assim como óleos essenciais e substâncias fenólicas, os aminoácidos não peptídicos são oriundos de modificações em rotas do metabolismo primário e cujos produtos podem ser utilizados pelos vegetais na defesa contra predadores e parasitas, assim como facilitar o melhor aproveitamento dos recursos limitantes do meio por suprimir a competição, ou ao menos mitigá-la, a ponto de sua influência ser mínima (BELL, 1976). Entre as famílias que mais apresentam espécies acumuladoras desse tipo de composto está Fabaceae. Assim como as demais plantas da família, *Leucaena leucocephala* (Lambert) de Wit. apresenta grande quantidade de proteínas e aminoácidos livres em seus tecidos, sendo alguns destes, ditos incomuns, encontrados em altas concentrações nos tecidos desses vegetais.

Nos últimos anos, novas aplicações a compostos como a L-mimosina, têm sido procuradas. Entre os novos usos pesquisados, encontra-se a utilização no controle de insetos (ISHAAYA et al., 1991; MITCHELL et al., 1993; HUANG et al., 2011) e microrganismos (HARTNEY et al., 2007). No entanto, é necessário que se conheça o efeito desses compostos sobre as plantas de interesse econômico, pois alternativas sustentáveis devem garantir o controle de organismos indesejáveis, mas também a manutenção das características desejadas da cultura em produção.

Entre os primeiros ensaios para utilização de novos compostos, encontram-se os bioensaios. Sua grande versatilidade advém do fato de permitirem um controle bastante amplo das condições ambientais, a ponto de permitir a compreensão dos resultados obtidos, sem a interferência de fatores externos pouco previsíveis, como a ocorrência de pragas e doenças de solo ou variações bruscas de temperatura e luminosidade. Os biotestes permitem ainda o trabalho com diversas variáveis, cuja sensibilidade poderia ser afetada por condições adversas não programadas. Entre as variáveis mais utilizadas encontra-se a porcentagem de germinação. Apesar de ser bastante responsiva, esta não deve ser encarada como única variável de avaliação (FERREIRA; AQUILA, 2000). Variáveis que possam estimar a dispersão da germinação no tempo, bem como relacionar a frequência em determinado espaço

de tempo à uniformidade fisiológica de um lote de sementes também são importantes para a compreensão da dinâmica encontrada. Variáveis com essas características vêm sendo utilizadas, como a velocidade média de germinação, coeficiente de variação do tempo, sincronia e os tempos médio, inicial e final do processo (RANAL; SANTANA, 2006). Igual importância deve ser dada à morfologia das plântulas submetidas a meios que induzam o estresse, como a presença de compostos alelopáticos, uma vez que a alteração do padrão germinativo ou de emergência pode ser menos drástica que a ação direta desses compostos nos tecidos jovens das plântulas (FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

Visto que o uso de L-mimosina pode vir a ser uma alternativa ao uso de substâncias sintéticas no controle de pragas e doenças que surgem durante o cultivo desta cultura, o presente trabalho teve como objetivo quantificar a influência do extrato aquoso de leucena, rico em L-mimosina, sobre a emergência de plântulas de feijoeiro

### **MATERIAL E MÉTODOS**

As folhas de *Leucaena leucocephala* foram coletadas no Parque Linear do Córrego do Óleo, na zona urbana de Uberlândia, Minas Gerais, no mês de fevereiro de 2012. O material foi coletado de 10 plantas distintas localizadas às margens do córrego que corta o referido Parque. As folhas foram destacadas dos ramos e secadas em temperatura ambiente em local sombreado. Após a secagem, o material foi triturado em moinho de facas e acondicionado em recipiente plástico revestido de papel-alumínio, tendo sido mantido a 8°C até sua utilização.

Pó de folhas secas de leucena foi fervido em água por 5 minutos, na proporção de 100 g de folhas secas para 1 L de água destilada e a solução obtida foi filtrada a vácuo, em papel de filtro qualitativo Whatman n° 5. Esta solução filtrada foi levada à fervura a fim de reduzir seu volume à metade e assim pôde ser utilizada no preparo das concentrações correspondentes aos tratamentos. A concentração de L-mimosina no extrato aplicado foi determinada utilizando-se três amostras dos extratos, segundo método adaptado de Matsumoto e Sherman (1951). Para isto, 20 mL de cada amostra foram fervidos com 30 mg de carvão ativado por 15 minutos. Após fervura, estas foram filtradas. Em frascos de 15 mL foram adicionados 4 mL de solução de cloreto férrico a 0,5% em HCl 0,1 M; 1 mL da solução oriunda de cada amostra e 5 mL de solução de HCl 0,1 M. O complexo formado com a mistura foi levado a um espectrofotômetro de UV/VIS Hitachi 2000 com comprimento de onda regulado em 535 nm para leitura de sua absorbância. A concentração de L-mimosina foi obtida pela expressão matemática  $y = 2,252 \times \frac{v_f(a_{am} - a_b)}{20}$ , onde y: concentração de L-mimosina em mg L<sup>-1</sup>; v<sub>f</sub>:

volume da amostra após fervura; aam: absorvância da amostra a 535 nm; ab: absorvância do branco

Os tratamentos consistiram de quatro concentrações, incluindo 0,3184 mg, 0,6368 mg, 0,9551 mg e 1,2735 mg de L-mimosina por grama de sementes em teste e o controle com água destilada. A massa de sementes considerada para a determinação das concentrações foi a obtida por secagem a 70 °C até massa constante de 8 amostras de 100 sementes cada, que correspondeu a 26,83 g ± 0,51 g por 100 sementes.

O teste de emergência foi conduzido com sementes de feijoeiro, cultivar Pérola, semeadas em vermiculita expandida super fina (volume de expansão de 0,1 m<sup>3</sup>), em caixas do tipo gerbox, mantendo-se a umidade a 70% de sua capacidade de campo. O experimento foi instalado em câmara de germinação e desenvolvimento (Seedburo Equipment Company, modelo MPG – 2000), sob luz branca fluorescente contínua (7,834 ± 4,709 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), entre 25 e 27 °C, delineamento inteiramente casualizado (DIC), composto de 4 concentrações e uma testemunha, cada uma com 4 repetições de 25 sementes cada. As leituras foram feitas em intervalos de 12 horas. Sempre que necessário foi adicionada água destilada para manter a vermiculita a 10% da capacidade de campo.

Foram avaliados a porcentagem de emergência ( $E$ ); os tempos inicial ( $t_0$ ), médio ( $\bar{t}$ ) e final ( $t_f$ ); a velocidade média ( $\bar{v}$ ); o coeficiente de variação do tempo ( $CVt$ ) e a sincronia ( $Z$ ) do processo de emergência, conforme sugerido por Ranal e Santana (2006). O critério utilizado para considerar uma plântula emergida foi o aparecimento da alça hipocotiledonar acima do nível do substrato.

Após a estabilização da emergência nas parcelas, as mesmas foram retiradas da câmara de germinação e desenvolvimento e deixadas em bancada a 25 °C por sete dias, sob iluminação natural, antes de serem avaliadas morfológicamente. A análise morfológica consistiu na observação e registro fotográfico das anomalias induzidas pela L-mimosina, sendo contabilizadas como porcentagem de ocorrência. Avaliações de comprimento e massa não foram tomadas em virtude da diferença de idade entre as plântulas. As anomalias contabilizadas foram plântulas estioladas, morte da raiz primária, morte da raiz secundária, raízes superficiais, plântulas não emergidas e sementes mortas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando os dados se mostraram estatisticamente significantes pelo teste de  $F$  a 0,05 de probabilidade, estes foram submetidos à regressão linear, quadrática e cúbica, a fim de encontrar o melhor modelo ajustado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a maioria das características analisadas não houve resposta do feijoeiro aos tratamentos empregados, à exceção da sincronia do processo de emergência (Figura 1). Ferreira e Áquila (2000) relatam respostas expressivas da porcentagem de emergência como uma tendência em biotestes desse tipo, no entanto, relatam ainda que apenas a germinabilidade ou porcentagem de emergência não podem caracterizar a ação de grande parte dos compostos, já que o efeito de muitos aleloquímicos, como a L-mimosina, pode se dar na distribuição da emergência no tempo. No presente trabalho, a porcentagem de emergência não apresentou diferença quando do uso de extratos nas diferentes concentrações.

A sincronia do processo de emergência é importante variável que permite o entendimento dos vegetais enquanto grupo populacional. Populações que apresentam altos valores de sincronia indicam que o meio a que são submetidas apresentam pouca limitação ao seu desenvolvimento. Ambientes favoráveis são capazes de oferecer os recursos necessários a mais indivíduos de uma mesma espécie, ocasionando a colonização desse espaço por mais indivíduos ao mesmo tempo. No referido ensaio, a sincronia do grupo de sementes em teste foi reduzida até a concentração de 0,6336 mg por grama de sementes em teste (Figura 1). A elevação da sincronia após esse ponto pode ser uma resposta ao aumento do estresse decorrente das maiores concentrações de L-mimosina, já que populações sob alto estresse podem também apresentar menor dispersão no tempo, visto que já não contam com alternativas para resistir ao fator que limita seu desenvolvimento (Figura 1).

Extratos com altas concentrações de L-mimosina influenciaram negativamente o desenvolvimento do sistema radicular das plântulas de feijoeiro, induzindo a morte das raízes primária e secundárias (Figura 2). A maioria das raízes secundárias presentes se concentrou na camada mais superficial do perfil do substrato (Figura 3), provavelmente como consequência da maior concentração de L-mimosina no fundo das caixas gerbox. Schenk e Werner (1991) obtiveram resposta semelhante com  $\beta$ -(3-isoxazolin-5-on-2-il)-alanina, um aminoácido não peptídico encontrado em *Pisum sativum* L. Os efeitos relatados por esses autores foram mais efetivos na interferência do crescimento da radícula e parte aérea de espécies não pertencentes à família Fabaceae.

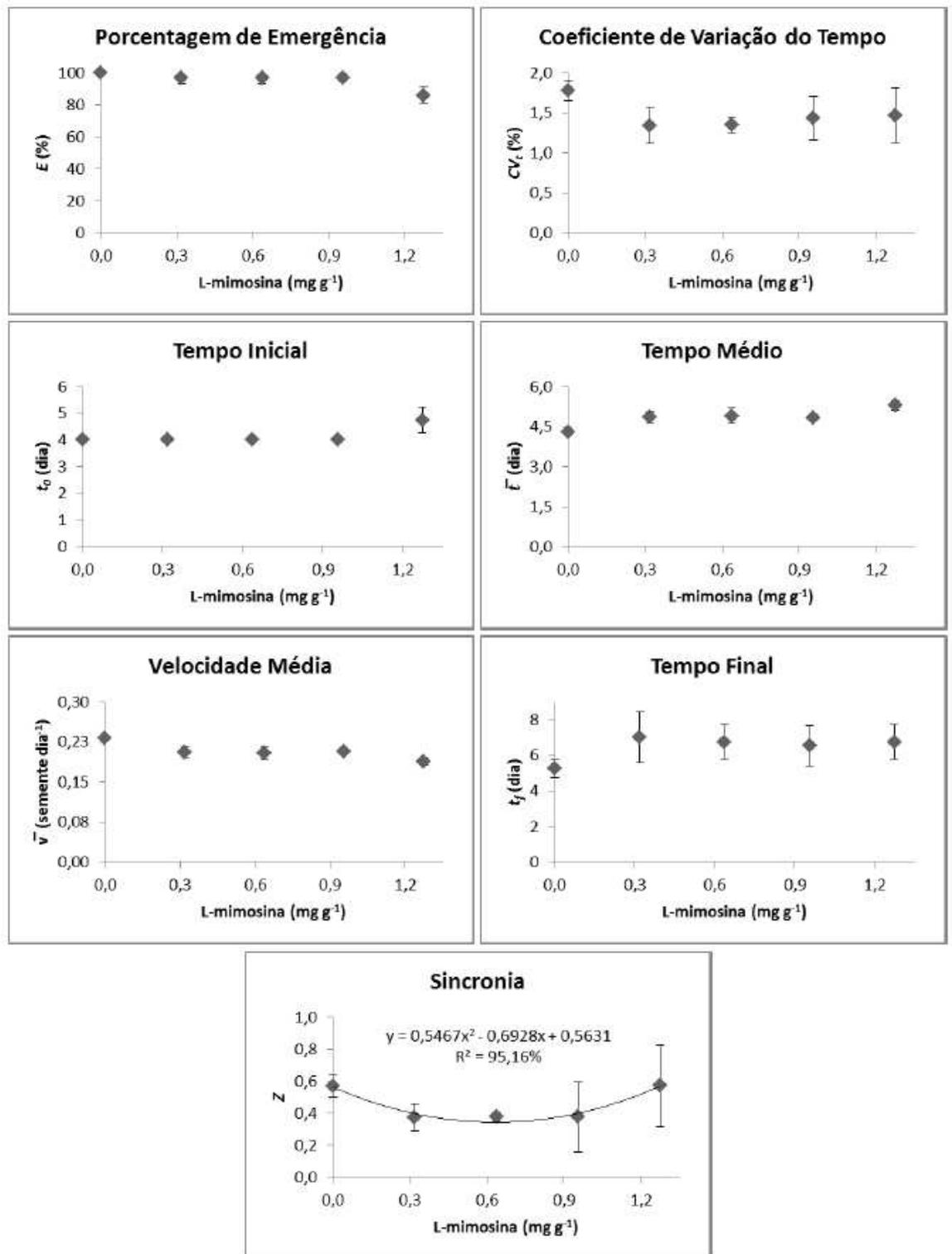


Figura 1: Variáveis do processo de emergência de plântulas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) submetidas a diferentes concentrações de L-mimosina extraída de folhas de *Leucaena leucocephala* (Lambert) de Wit. Gráficos sem linha de regressão indicam que a mesma não foi significativa ( $R^2 < 70\%$  à probabilidade de 0,05 pelo teste  $F$ ).

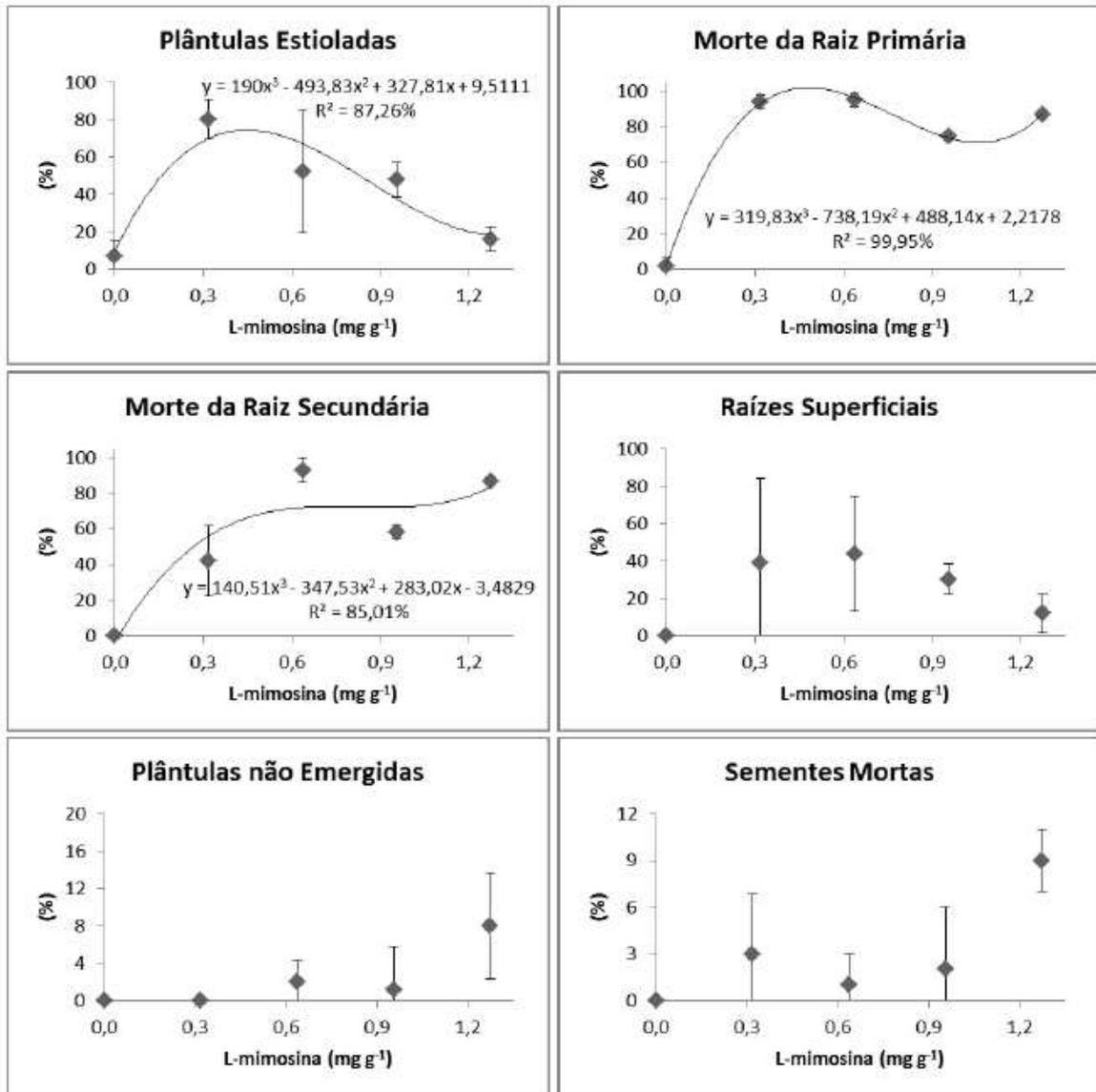


Figura 2: Anormalidades morfológicas de plântulas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) submetidas a diferentes concentrações de L-mimosina extraída de *Leucaena leucocephala* (Lambert) de Wit. Gráficos sem linha de regressão indicam que a mesma não foi significativa ( $R^2 < 70\%$  à probabilidade de 0,05 pelo teste  $F$ ).



Figura 3: Anormalidades morfológicas de plântulas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) submetidas a diferentes concentrações de L-mimosina extraída de *Leucaena leucocephala* (Lambert) de Wit.

Segundo Williams e Hoagland (1984) e Reis et al. (1999), a resposta a compostos com propriedades aleloquímicas ocorre com maior frequência no comprimento de raiz primária e parte aérea de plântulas. A fase de maior influência no controle de plantas é justamente a de plântula, em virtude de nesta fase se determinarem os potenciais produtivos dos indivíduos,

bem como a ocorrência do estabelecimento da plântula no hábitat (INDERJIT; DAKSHINI, 2000). A agricultura já tem conhecimento da importância dessa fase no ciclo dos vegetais há muito tempo. Por isto, o controle químico de plantas daninhas é recomendado nas fases iniciais do desenvolvimento da flora indesejada (LORENZI, 2006).

No presente ensaio, foram observadas plântulas com raízes primária e secundárias mortas, submetidas à concentração de 0,9551 mg g<sup>-1</sup> (Figura 3 – a); plântulas com morte de raiz primária aliada à intensa produção de raízes secundárias superficiais, submetidas à 0,3184 mg g<sup>-1</sup> (Figura 3 – b); plântulas desprovidas de raízes primária e secundárias submetidas à concentração de 1,2735 mg g<sup>-1</sup> (Figura 3 – c) e plântulas estioladas, com morte de raiz primária e intensa produção de raízes secundárias, submetidas à concentração de 0,6386 mg g<sup>-1</sup> (Figura 3 – d). Essas observações demonstram o potencial de interferência dos extratos de leucena na fase inicial da cultura do feijoeiro, o que se torna ainda mais evidente quando se observa o aspecto geral do ensaio (Figura 3 – e). Doses superiores a 0,3 mg g<sup>-1</sup> foram capazes de induzir a morte de raízes primária e secundárias em mais de 60% das plântulas (Figura 2), indicando grande interferência na ontogênese desses órgãos.

O sistema radicular é a grande ligação das plantas com o meio físico que as suporta. É o caminho para a entrada de nutrientes minerais, água, oxigênio e cumpre o importante papel de fixar o caule dos vegetais a fim de que estes possam aproveitar o recurso mais importante à vida dos vegetais superiores, a luz. A má formação das raízes impedirá que todos esses fatores sejam ofertados em quantidade e qualidade adequados aos exigidos para a boa manutenção do estado fisiológico dessas plantas. Do ponto de vista agrônomo, a utilização de compostos para o controle de pragas e doenças não pode interferir significativamente na fisiologia das culturas de interesse, o que faz da L-mimosina um composto que merece mais estudos antes de sua recomendação em cultivos comerciais. A obtenção de plantas com sistema radicular pequeno induz a acamamento das mesmas, o que de fato não é interessante para a atividade agrícola, visto que aumenta gastos com colheita e reduz a qualidade do produto final.

Extratos aquosos de leucena podem reduzir a germinação e emergência de milho, bem como a redução do crescimento de raízes, divisão mitótica, aumento da atividade da peroxidase nas raízes, induzindo ao espessamento das mesmas (PIRES et al., 2001). Afirma-se ainda que a L-mimosina é capaz de interferir de maneira significativa na taxa de alongamento das cadeias de ácidos nucleicos, no momento da replicação do DNA e na transcrição de RNA, o que pode impedir ou dificultar a multiplicação de células e a produção de proteínas pelo organismo afetado. Seus efeitos são ocasionados por interferência nos

períodos G1 e S do ciclo celular, o que dificulta a continuidade da divisão celular (KALEJTA; HAMLIN, 1997).

Assim como a morte de raízes, o estiolamento das plântulas é uma característica pouco interessante quando se trata de cultivos comerciais. O extrato de leucena utilizado induziu as plântulas de feijoeiro ao estiolamento nas concentrações mais baixas (Figura 2). Nas concentrações mais altas, apesar de ainda ocorrer, foi menos marcante, provavelmente em virtude de outros danos ocasionados pela L-mimosina em outras partes da planta. Isso pode ter acontecido devido aos altos teores de N e compostos nitrogenados em folhas de leguminosa, como a leucena. Garcia et al. (1995) relatam teores expressivos de compostos em folhas de leucena como 4,15% de nitrogênio, 29,2% de proteína bruta e 4,3% de L-mimosina. Há relatos de até 8% de L-mimosina em tecido foliar, segundo os mesmos autores. Altas concentrações de N no meio induzem ao crescimento dos tecidos de maneira rápida, com pouco investimento em paredes celulares, o que torna esses tecidos vulneráveis à quebra e ataque de patógenos.

De maneira abrangente, foi possível observar e quantificar a influência do extrato aquoso de *Leucaena leucocephala* rico em L-mimosina sobre as plântulas de feijoeiro. É de especial importância a adequação da dose a ser aplicada, a fim de evitar a ocorrência de anomalias morfológicas em plântulas desta cultura e assim obter os benefícios do uso da L-mimosina. O estudo dos efeitos desta substância nas espécies comumente encontradas na comunidade infestante de cultivos de feijão também se faz necessário, a fim de garantir sua utilização efetiva para o controle dessas plantas indesejadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELL, E. A. 'Uncommon' amino acids in plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 29-35, 1976.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente na ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, n. 12, p. 175-205, 2000.

GARCIA, J. W.; FERGUSON, T. U.; NECKLES, F. A.; ARCHIBALD, K. A. E. The nutritive value and forage productivity of *Leucaena leucocephala*. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 60, p. 29-41, 1996.

HARTNEY, S.; CARSON, J.; HADWIGER, L. A. The use of chemical genomics to detect functional systems affecting the non-host disease resistance of pea to *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. **Plant Science**, Limerick, v. 172, p. 45-56, 2007).

HUANG, T.; JANDER, G.; DE VOS, M. Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: Representative cases and opportunities for further functional analysis. **Phytochemistry**, New York, v. 72, p. 1531-1537, 2011.

INDERJIT; DAKISHINI, K.M.M. On laboratory bioassays in alleopathy. **The Botanical Review**, New York, v. 61, n. 1, p. 28-44, 1995.

ISHAAYA, I.; HIRASHIMA, A.; YABLONSKI, S.; TAWATA, S.; ETO, M. Mimosine, a Nonprotein Amino Acid, Inhibits Growth and Enzyme Systems in *Tribolium castaneum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 39, p. 35-42, 1991.

KALEJTA, R.F.; HAMLIN, J.L. 1997. The dual effect of mimosine on DNA replication. **Experimental Cell Research**, New York, v. 231, p. 173–183, 1997.

LORENZI, H. **Manual de Identificação e Controle de Plantas Daninhas: plantio direto e convencional**. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2006. 385p.

MATSUMOTO, H; SHERMAN, G. D. A rapid colorimetric method for the determination of mimosine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, p. 195-200, 1951.

MITCHELL, M. J.; KEOGH, D. P.; CROOKS, J. R.; SMITH, S. L. Effects of Plant Flavonoids and Other Allelochemicals on Insect Cytochrome P-450 Dependent Steroid Hydroxylase Activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 65-71, 1993.

PIRES, N. M.; SOUZA, I. R. P.; PRATES, H. T.; FARIA, T. C. L.; PEREIRA-FILHO, I. A.; MAGALHÃES, P. C. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 1, p. 55-65, 2001.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process?. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n.1, p. 1-11, 2006.

REIS, P.J., SAHLU, T., AND GOETSCH, A.L. Effects of mimosine and 2,3-dihydroxypyridine on fiber shedding in Angora goats. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, p. 1487-1492, 1999.

SCHENK, S. U.; WERNER, D.  $\beta$ -(3-isoxazolin-5-on-2-il)-alanina from *Pisum*: allelopathic properties and antimycotic assay. **Phytochemistry**, New York, v. 30, n. 2, p. 467-470, 1991.

WILLIAMS, R.D.; HOAGLAND, R.E. The effects of naturally occurring compounds on seed germination . **Weed Science**, Champaign, v. 30, p. 206-212, 1984.

## CONCLUSÕES

- O controle de tombamento de plântulas de tomateiro pelo uso de extratos ricos em L-mimosina mostra-se interessante e viável, semelhante a outras alternativas ao controle químico.
- Os extratos de *Leucaena leucocephala* ricos em L-mimosina possuem pequeno efeito negativo sobre o processo de emergência de plântulas de feijoeiro e fedegoso, tendo algum efeito em características relativas à dispersão da emergência no tempo;
- Os extratos ricos em L-mimosina foram capazes de gerar anomalias morfológicas em plântulas de feijoeiro, capazes de dificultar ou impedir o estabelecimento das plântulas afetadas no campo.