UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

FCA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
UNESP | BOTUCATU

ROQUE DE CARVALHO DIAS

EFEITO ALELOPÁTICO DE MUCUNA-PRETA (*Mucuna pruriens* var. *utilis*)

BOTUCATU

2022

ROQUE DE CARVALHO DIAS

EFEITO ALELOPÁTICO DE MUCUNA-PRETA (*Mucuna pruriens* var. *utilis*)

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de e Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini
Coorientador: Prof Dr. Leandro Tropaldi

Botucatu

2022

D541e

Dias, Roque de Carvalho
Efeito alelopático de mucuna-preta (Mucuna pruriens var. utilis) / Roque de Carvalho Dias. -- Botucatu, 2022
92 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu
Orientador: Edivaldo Domingues Velini
Coorientador: Leandro Tropaldi

1. Alelopatia. 2. Planta de cobertura. 3. Trocas gasosas. 4. Atividade enzimática. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

FCA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
UNESP | BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITO ALELOPÁTICO DE MUCUNA-PRETA (Mucuna pruriens var. utilis)

AUTOR: ROQUE DE CARVALHO DIAS
ORIENTADOR: EDIVALDO DOMINGUES VELINI
COORIENTADOR: LEANDRO TROPALDI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI (Participaçao Presencial)
Protecao Vegetal / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu UNESP

Prof. Dr. CAIO ANTONIO CARBONARI (Participaçao Presencial)
FCAUNESP / BotucatuSP

Prof. Dr. MARCELO DE ALMEIDA SILVA (Participaçao Presencial)
Departamento de Producao Vegetal / FCA / UNESP - Botucatu

P/ Prof. Dr. GUILHERME BRAGA PEREIRA BRAZ (Participaçao Virtual)
Faculdade de Agronomia / Universidade de Rio Verde

Prof. Dr. LUCIANO SOARES DE SOUZA (Participaçao Presencial)
Agronomia / Unisalesiano

Botucatu, 31 de outubro de 2022

A Deus,

Aos meus amados pais, Cassia e José Carlos,

Aos meus irmãos Rafael e Michelly,

Aos meus familiares,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus sobre todas as coisas, o dom da vida, saúde, sabedoria e amor durante todos os momentos da minha vida pessoal, acadêmica e profissional.

Aos meus pais Cassia Simone de Carvalho e José Carlos Dias, pela imensa dedicação, amor, cuidado e apoio incondicional em todos os dias da minha vida. Apenas posso agradecer por tudo que vocês têm me dado, pois nunca conseguirei compensar devidamente a dedicação que sempre manifestaram. Vocês são uma bênção sem comparação e só espero que um dia os meus filhos possam sentir um orgulho igual por mim.

Aos meu irmãos Rafael de Carvalho Dias e Michelly de Carvalho Dias, por se manterem presentes mesmo na ausência, se mantiveram incansáveis em suas manifestações de apoio e carinho. Pelas palavras e pela transmissão de confiança e força, em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini, pela orientação, paciência, disponibilidade, oportunidades, pelos sábios conselhos e contribuição a minha formação pessoal e profissional. Saliento as conversas e reflexões fundamentais ao longo desse percurso. Os seus ensinamentos foram muito além dos conteúdos teóricos, são uma inspiração.

Ao Prof. Dr. Caio Antônio Carbonari, que considero meu segundo orientador e agradeço a disponibilidade, confiança, oportunidades, incentivo e por prontamente me ajudar sempre que o procurei.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Leandro Tropaldi, pela sua disponibilidade na realização dos trabalhos, convivência, conselhos e amizade.

Ao Prof. Dr. Caio Augusto de Castro Grossi Brunharo e a Oregon State University, por me receber e possibilitar a realização do doutorado sanduíche.

Aos técnicos e grandes amigos do Laboratório Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), José Guilherme Cordeiro, José Roberto Marques da Silva e Luiz Marcelo Siono, pelo apoio em todos os momentos, aprendizado, paciência e colaborações nas atividades realizadas. Sem dúvida, foram e são pessoas importantes durante esse percurso.

A todos os amigos que estiveram juntos nessa jornada, Ana Karollyna Alves de Matos, Andreia Kazumi Suzukawa, Carolina Pucci de Moraes, Diego Munhoz Gomes, Gabrielle de Castro Macedo, Giovanna Larissa Gimenes Cotrick Gomes, Guilherme

Bacarim Pavan, Isabella Rubio Cabral, Ivana Paula Ferraz Santos de Brito, Ivana Santos Moisinho, Izabela Thaís dos Santos, Jéssica Alves Bonamichi, Laís Maria Bonadio Precipito, Leandro Bianchi, Lucas Baiochi Riboldi, Maria Lúcia Bueno Trindade, Olivia Pak Campos, Plinio Saulo Simões, Raphael Mereb Negrisoli, Renan Fonseca Nascentes, Tais Santo Dadazio, Tamara Thaís Mundt e Vitor Muller Anunciato, pelo companheirismo e pelos diversos trabalhos desenvolvidos. Não poderia esquecer o “Manivela”, o gato mascote do laboratório.

Aos meus professores Sérgio da Silva Peixoto e Maria Angelica Nocite Mendonca Peixoto pela amizade, incentivo e motivação para o ingresso em uma Universidade Pública.

Ao meu orientador da graduação, Prof. Dr. Marcelo Rodrigues dos Reis, que seus conselhos e sugestões bem como a permanente valorização do trabalho foram determinantes para a escolha da pós-graduação.

Aos professores doutores Christiane Augusta Diniz Melo, Daniel Valadão Silva, Paulo Vinicius da Silva e o Dr. Autieres Teixeira Faria pelos ensinamentos, incentivos e colaborações para meu ingresso e durante a minha trajetória na pós-graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (Proteção de Plantas) da Faculdade de Ciências Agronômicas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu-SP por permitir a obtenção desse título.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização e conclusão deste projeto.

Meus sinceros agradecimentos.

“Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda!”
(Mario Sergio Cortella)

RESUMO

A mucuna-preta é uma planta leguminosa, usada como planta de cobertura do solo, capaz de produzir vários compostos naturais ativos, incluindo o aminoácido não proteico L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) que possui efeito alelopático. No entanto, a constatação do efeito alelopático de uma planta necessita de ampla abordagem que envolve diferentes metodologias. Assim, deve-se considerar os diferentes métodos de extração e aplicação, organismos-alvo, uso do aleloquímico e/ou do material vegetal, concentração, avaliações, condição experimental, entre outros. Dessa forma, este trabalho teve os seguintes objetivos, avaliar: i) alelopatia das diferentes partes da planta da mucuna-preta por meio de bioensaios; ii) alelopatia da mucuna-preta em mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar; e, iii) o efeito da aplicação de L-DOPA nas trocas gasosas e atividade enzimática em plantas de capim-braquiária. Portanto, para cada objetivo foi conduzido um estudo. Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados e com pelo menos quatro repetições. No primeiro, o potencial alelopático de diferentes partes da mucuna-preta (folhas, caules e raízes) foi estudado pelo método do extrato aquoso e sanduíche utilizando-se a alface como planta indicadora. No segundo estudo, as MPB de cana-de-açúcar foram transplantadas em solo previamente cultivado com diferentes densidades de mucuna-preta (0, 2, 4 e 8 plantas por vaso com capacidade de 11 dm^3), sendo o comprimento de raiz e parte aérea, diâmetro e perfilhamento avaliados periodicamente, assim como as trocas gasosas (21, 42 e 63 dias após o transplantio - DAT) e biomassa seca aos 63 DAT. No terceiro estudo, foi investigado o efeito do L-DOPA aplicado via foliar ou em solução nutritiva em capim-braquiária. Nos experimentos com aplicações foliares, avaliou-se o comprimento de raiz e parte aérea, biomassa e trocas gasosas, enquanto no experimento com aplicação em solução nutritiva, foi analisado o comprimento de raiz e parte aérea, biomassa e atividade enzimática (superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT e peroxidase - POD). A germinação e vigor das plântulas de alface foram reduzidas com o uso da mucuna-preta pelo método do extrato aquoso e sanduíche. Os efeitos foram mais intensos quando utilizado na sequência de folha > raiz > caule da mucuna-preta. As MPB de cana-de-açúcar tiveram suas variáveis relacionadas ao crescimento limitadas quando o solo foi previamente cultivado com 4 e 8 plantas de mucuna-preta por vaso. Além disso, tiveram suas trocas gasosas afetadas negativamente principalmente nos

períodos iniciais de avaliação. No terceiro estudo, doses de 16 e 32 mg L^{-1} de L-DOPA aplicadas via folha, inibiram o crescimento do capim-braquiária e provocaram decréscimos iniciais nas trocas gasosas. A aplicação de L-DOPA via solução nutritiva, inibiu o crescimento das plantas de capim-braquiária e aumentou a atividade das enzimas SOD e POD com destaque para as raízes. Tanto a mucuna-preta como o L-DOPA apresentaram alelopatia negativa, sendo os efeitos influenciados pela metodologia utilizada, concentração, planta receptora, modo de aplicação e tempo de exposição.

Palavras-chave: Alelopatia; atividade enzimática; L-DOPA; planta de cobertura; trocas gasosas.

ABSTRACT

The velvet bean is a leguminous plant, used as a ground cover plant, capable of producing several active natural compounds, including the non-protein amino acid L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) which has an allelopathic effect. However, the allelopathic effect of a plant requires a broad approach that involves different methodologies. Thus, different extractions and application methods, target organisms, use of the allelochemical and/or plant material, concentration, evaluations, and experimental conditions must be considered. Thus, this work had the objective to evaluate: i) allelopathy of different parts of the velvet bean plant through bioassays; ii) velvet bean allelopathy in pre-sprouted sugarcane seedlings; and iii) the effect of L-DOPA application on gas exchange and enzymatic activity in signal grass plants. Therefore, a study was conducted for each objective. In the first bioassay, the allelopathic potential of different parts of the velvet bean (leaves, stems and roots) were studied by the aqueous extract and sandwich method, using lettuce as an indicator plant. In the second study, pre-sprouted seedlings (MPB) of sugarcane were transplanted in soil previously cultivated with different densities of velvet bean (0, 2, 4 and 8 plants per pot with a capacity of 11 dm^3). The root and shoot length, diameter and tillering were periodically evaluated, as well as gas exchange (21, 42 and 63 days after transplanting - DAT) and dry biomass at 63 DAT. In the third study, the effect of L-DOPA applied via foliar or nutrient solution on signal grass was investigated. In the experiments with foliar applications was evaluated root and shoot length, biomass, and gas exchange, while in the experiment with application in nutrient solution, we assess root and shoot length, biomass and enzymatic activity (superoxide dismutase - SOD, catalase - CAT and peroxidase - POD). All experiments were carried out in a completely randomized design with at least four replications. Data were submitted to ANOVA, means compared by Tukey's test, at 5% probability. The germination and vigor of lettuce seedlings were reduced with the use of velvet bean by the aqueous extract and sandwich method. The effects were more intense when used in the sequence of leaf > root > stem of velvet bean. Sugarcane MPB had their growth-related variables decreased when the soil was previously cultivated with 4 and 8 plants per pot. In addition, their gas exchanges were negatively affected, mainly in the initial evaluation periods. In the third study, doses of 16 and 32 mg L^{-1} of L-DOPA applied on leaves inhibited signal grass growth and caused initial decreases in gas exchange.

The application of L-DOPA via nutrient solution inhibited the growth of signal grass plants and increased the activity of SOD and POD enzymes, especially in the roots. Both velvet bean and L-DOPA showed negative allelopathy, and the effects could be influenced by the methodology used, concentration, receptor plant, application method and exposure time.

Keywords: Allelopathy; enzymatic activity; L-DOPA; cover plant; gas exchange.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO DE LITERATURA 19
2.1 INTERFERÊNCIA 19
2.2 MUCUNA-PRETA 21
2.3 L-3,4-DIHIDROXIFENILALANINA (L-DOPA) 23
3 MATERIAL E MÉTODOS 25
3.1 ESTUDO 1 - POTENCIAL ALELOPÁTICO DA MUCUNA-PRETA UTILIZANDO BIOENSAIOS 25
3.1.1 Método do extrato aquoso 26
3.1.2 Método sanduíche 28
3.1.3 Análise estatística 29
3.2 ESTUDO 2 - ALELOPATIA DA MUCUNA-PRETA EM MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR 30
3.2.1 Análise estatística 33
3.3 ESTUDO 3 - TROCAS GASOSAS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM PLANTAS DE CAPIM-BRAQUIÁRIA (*UROCHLOA DECUMBENS*) EXPOSTAS AO L-DOPA 34
3.3.1 Efeito de aplicação foliar de L-DOPA no crescimento 34
3.3.2 Efeito de aplicação foliar de L-DOPA nas trocas gasosas 35
3.3.3 Efeito do L-DOPA aplicado via solução nutritiva na atividade enzimática 36
3.3.4 Análise estatística 37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 39
4.1 ESTUDO 1 - POTENCIAL ALELOPÁTICO DA MUCUNA-PRETA UTILIZANDO BIOENSAIOS 39
4.1.1 Resultados - Método do extrato aquoso 39
4.1.2 Resultados - Método sanduíche 46
4.1.3 Discussão 49
4.2 ESTUDO 2 - ALELOPATIA DA MUCUNA-PRETA EM MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR 54
4.2.1 Resultados 54
4.2.2 Discussão 62

4.3 ESTUDO 3 - TROCAS GASOSAS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM PLANTAS DE CAPIM-BRAQUIÁRIA (*UROCHLOA DECUMBENS*) EXPOSTAS AO L-DOPA 67
4.3.1 Resultados - Efeito de aplicação foliar de L-DOPA no crescimento . 67
4.3.2 Resultados - Efeito de aplicação foliar de L-DOPA nas trocas gasosas 70
4.3.3 Resultados - Efeito do L-DOPA aplicado via solução nutritiva na atividade enzimática 72
4.3.4 Discussão 76
5 CONCLUSÕES 80
REFERÊNCIAS 81
APÊNDICE A 91
APÊNDICE B 92

1 INTRODUÇÃO

Na agricultura, a adubação verde por meio do uso de plantas de cobertura se apresenta como uma importante ferramenta. Essas plantas, apresentam diversas vantagens como proteção do solo, reciclagem de nutrientes, fixação de nitrogênio, entre outras. Além disso, em decorrência da possível liberação de compostos alelopáticos associados ao efeito físico da cobertura, demonstram potencial para uso dentro do manejo integrado de plantas daninhas.

Para o aproveitamento dessa característica, é necessário o conhecimento sobre as especificidades das plantas de cobertura, relações alelopáticas, comunidade das plantas daninhas na área e do sistema de rotação/sucessão de culturas. Dessa forma, se mal manejada, a cultura de cobertura pode se estabelecer no ambiente de produção, provocando prejuízos por meio da hospedabilidade de pragas e doenças, concorrência por recursos e possibilidade de se “transformar” em planta daninha com efeitos diretos no desenvolvimento e produção da planta cultivada.

Dentre as várias espécies utilizadas para essa finalidade, destaca-se a mucuna-preta. São plantas com ampla diversidade de espécies ao redor do mundo e caracterizadas pela sua importância econômica no ponto de vista ornamental e na agricultura. Apresentam boa cobertura do solo devido à grande quantidade de matéria orgânica, capacidade de fixação de nitrogênio, controle de nematoides, alimentação humana e animal, produção de aleloquímicos, entre outros (TARAWALI *et al*., 1999; CARSKY; BECKER; HAUSER, 2001, JORGE *et al*., 2007).

O principal composto alelopático encontrado na mucuna-preta é o aminoácido não-protéico L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (FUJII; SHIBUYA; YASUDA, 1991, FUJII; SHIBUYA; YASUDA, 1992). Desse modo, o cultivo da mucuna-preta, além de apresentar diversos benefícios e ser amplamente utilizada como planta de cobertura, pode também impactar negativamente outras plantas. A presença do L-DOPA no ambiente tem reduzido a germinação e o crescimento de plantas sensíveis (BIDO *et al*., 2018).

Nesse contexto, um dos maiores desafios é determinar o mecanismo de ação dos aleloquímicos, realizar a separação dos efeitos primários e secundários e analisar seu efeito em organismos não-alvo. Além disso, uma das grandes dificuldades acerca das atividades desses compostos é uma clara explicação para as diferenças de sensibilidade existente entre as espécies. Dessa forma, há necessidade de trabalhos

que avaliem o efeito alelopático da mucuna-preta em outras plantas, como o caso da cana-de-açúcar e capim-braquiária. Ademais, são escassos os estudos que conseguiram avaliar adequadamente a alelopatia de plantas de mucuna-preta em diferentes culturas, uma vez que tendo em vista o objetivo, muitas metodologias podem ser empregadas e a nível de campo, existe a dificuldade na separação dos efeitos de competição e alelopatia na interferência entre plantas.

A análise na definição dos componentes dentro do sistema produtivo, como por exemplo, a escolha da planta de cobertura e a cultura em rotação/sucessão é de suma importância. Para isso, faz-se necessário, conhecer os efeitos do cultivo da mucuna-preta e/ou da aplicação do L-DOPA no crescimento e desenvolvimento de outras plantas. A variabilidade de respostas e os efeitos controversos sobre as espécies estudadas são pontos que desafiam os pesquisadores na busca do entendimento sobre esses compostos.

Assim, diante do exposto, objetivou-se avaliar: i) o potencial alelopático das diferentes partes da planta de mucuna-preta utilizando o método de extrato aquoso e sanduíche; ii) alelopatia em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar após o cultivo de da mucuna-preta e iii) o efeito da aplicação foliar de L-DOPA nas trocas gasosas e em solução nutritiva na atividade enzimática em plantas de capim-braquiária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INTERFERÊNCIA

Para a sustentabilidade do sistema produtivo é fundamental a sua associação a um sistema de rotação e de sucessão de culturas diversificado, que produza a adequada quantidade de resíduos culturais na superfície do solo. Nesse sentido, destaca-se o uso das plantas de cobertura. No Brasil, há diversas plantas que são utilizadas com esse intuito, como a família das leguminosas (Fabaceae), com importância, a crotalária, ervilhaca, feijão-guandu, feijão-de-porco, mucuna-preta, tremoço entre outras (LAMEGO *et al*., 2015). Entretanto, se mal manejado, a cultura utilizada para essa função pode se transformar em planta daninha importante para os cultivos subsequentes (SILVA *et al*., 2006).

Em termos gerais, podemos considerar as plantas daninhas como qualquer espécie vegetal que cresce onde não é desejada e ao conviver com as culturas agrícolas interferem no seu desenvolvimento, reduzindo-lhes a produtividade ou algum processo relacionado (PITELLI, 2015).

Assim, a interferência da planta daninha refere-se ao conjunto de ações que recebe uma determinada cultura ou atividade do homem, em decorrência da presença das plantas daninhas num determinado ambiente (PITELLI, 1985). Diversos fatores podem influenciar o grau de interferência de plantas daninhas em uma cultura e podem estar relacionados à comunidade infestante (composição específica, densidade e distribuição), à cultura (espaçamento, densidade e cultivar) e ao ambiente (solo, clima e práticas de manejo adotadas) (PITELLI, 1985). Dessa forma, o manejo que condiciona as melhores condições à cultura, como a ocupação do meio de forma mais eficiente e o uso de conhecimento sobre a habilidade competitiva das plantas daninhas poderá contribuir na redução da interferência da comunidade infestante sobre a cultura.

Os prejuízos observados em plantas cultivadas em função da presença das plantas daninhas podem ser de ordem direta e indireta. Diretamente, os dois principais processos que afetam a produção é a competição pelos recursos do meio (água, luz, nutrientes e espaço, por exemplo) e alelopatia. Vale destacar que a principal diferença entre alelopatia e competição é o fato que a competição remover os fatores de crescimento (água, nutrientes, entre outros) do meio, enquanto, que a alelopatia,

ocorre adição de substâncias ao meio, denominadas de aleloquímicos (FERREIRA; AQUILA, 2000). Já os prejuízos causados indiretamente, normalmente estão relacionados quando as plantas daninhas atuam como hospedeiras alternativas de pragas, doenças e nematoides, provocam intoxicações, atrapalham os tratos culturas e/ou colheita, entre outros (CONCENÇO *et al*., 2014).

Devido à complexidade dos efeitos diretos, juntamente com os diversos fatores que operam em conjunto na natureza, diversos autores afirmam sobre a dificuldade em separar, principalmente em ambiente natural, a alelopatia da competição (INDERJIT; DEL MORAL, 1997). Ainda nesse contexto, fica evidente a dificuldade em distinguir os efeitos de competição e/ou alelopatia de culturas de coberturas e/ou que são cultivadas em consórcio quando se refere a interferência. De forma geral, há poucos trabalhos no Brasil que avaliaram a interferência da mucuna-preta em outras culturas. Além disso, na maioria dos casos a interferência dessa planta é apenas respondida como uma resposta pela competição. A mucuna-preta em competição com amendoim (SILVA *et al*., 2020), cana-de-açúcar (BRESSANIN *et al*., 2016) e sorgo (NAKAGAWA *et al*., 2009) reduziu a produtividade dessas culturas.

O termo alelopatia foi definido por Hans Molisch, em 1937, como o efeito que uma planta exerce sobre outra devido à produção e à liberação de metabólitos secundários no ambiente, afetando seu crescimento e seu desenvolvimento, de forma benéfica ou prejudicial (RICE, 1984). Os aleloquímicos são resultantes do metabolismo secundário e responsáveis por produzir os efeitos alelopáticos sobre o metabolismo de espécies receptoras (TAIZ *et al*., 2017). Eles são sintetizados em organelas celulares e armazenados em estruturas especializadas com o intuito de proteger os processos metabólicos da planta de seus efeitos tóxicos (REIGOSA *et al*., 2013). Assim, de modo geral, a produção desses compostos pode variar em qualidade e quantidade de espécie para espécie, na quantidade do aleloquímico de um local de ocorrência, ciclo, estádio vegetativo, entre outros (FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

São quatro os meios de liberação de compostos químicos pelas plantas: decomposição, lixiviação, volatilização e exsudação radicular (EINHELLIG, 1995). A interação alelopática, de uma forma geral, depende da concentração e estabilidade dos aleloquímicos, da atividade microbiana e da tolerância da planta (BLUM; SHAFER; LEHMAN, 1999). A ação dos compostos alelopáticos nas plantas pode apresentar alguns efeitos específicos como: modificação na estrutura e no transporte das membranas, alterações das características da morfologia celular, interferência no

ciclo celular (replicação, síntese de proteínas, mitose, mecanismos celulares), modificação da atividade de fitormônios, perturbação do metabolismo energético (respiração e fotossíntese), problemas no balanço de água e na função dos estômatos, inibição de síntese de pigmentos e bloqueio da função de numerosas enzimas (EINHELLIG, 1986; EINHELLIG, 2002). Além disso, é possível que a fitotoxicidade de muitos compostos não seja devida a um sítio localizado de interferência, mas talvez decorrente da ação sobre múltiplos sítios (EINHELLIG, 1995).

Ao longo de muitos anos, diversos pesquisadores vêm elaborando formas de comprovar a existência da alelopatia, dos compostos envolvidos e as formas de atuação. Sendo assim, compreender as interações alelopáticas entre plantas em uma comunidade não é uma tarefa simples. Para separar os efeitos da competição por recursos e da alelopatia, experimentos podem ser conduzidos onde as plantas são cultivadas em ambientes sem competição com as espécies receptoras exibindo assim os potenciais alelopáticos (QASEM 2017).

Dessa forma, segundo Mahé *et al*. (2022), para investigações sobre alelopatia deve-se considerar por exemplo, a caracterização da planta e do composto estudado, os efeitos em diferentes culturas e/ou variedades, nos parâmetros de avaliação, repetibilidade, condições de cultivo como água, nutrientes entre outros, ambientes controlados e/ou campo, quantificação e a contribuição de cada característica/mecanismo estudado na explicação do efeito encontrado.

2.2 MUCUNA-PRETA

O gênero *Mucuna*, pertencente à família Fabaceae, é originário do sul da Ásia e compreende aproximadamente 150 espécies de leguminosas anuais e perenes (DUKE, 1981; MOURA *et al*., 2018). Apesar de sua morfologia diversificada, estudos filogenéticos moleculares baseados em marcadores nucleares e de cloroplastos mostram que o gênero da *Mucuna* é monofilético (MOURA *et al*., 2016) e que três subgêneros são atualmente reconhecidos *Mucuna* subg. *Stizolobium*, *Mucuna* subg. *Macrocarpa* e *Mucuna* subg. *Mucuna* (MOURA *et al*., 2018). As principais diferenças entre as espécies cultivadas são as características da pubescência da vagem, a cor da semente e o tempo para a colheita da vagem (DEMUNER *et al*., 2003).

A *Mucuna pruriens* (L.) DC. é uma das espécies do gênero com grande importância em países tropicais como América Central e do Sul (RAINA; TOMAR; DUTTA, 2012). Vale destacar que essa espécie também é referida na literatura pelos sinônimos *Mucuna aterrima* (Piper & Tracy), *Mucuna nivea* (Roxb.) DC. ex Wight, *Stizolobium aterrimum* Piper & Tracy, *Stizolobium pruriens* var. *hassjoo* (Piper & Tracy) Makino, entre outras (WIRIADINATA; OHASHI; ADEMA, 2016; ILDIS, 2022; WFO, 2022).

Além disso, essa espécie é caracterizada pela diversidade de variedades, com destaque para a *Mucuna pruriens* var. *pruriens* e *Mucuna pruriens* var. *utilis* (Wall. ex Wight) Burck (WIRIADINATA; OHASHI; ADEMA, 2016). Uma das principais diferenças entre as duas variedades de *M*. *pruriens* é a caracterização da semente. A *M*. *pruriens* var. *pruriens* tem frutos que carecem ornamentação e possuem um denso indumento de pêlos longos e dourados enquanto *M*. *pruriens* var. *utilis* possui frutos ornamentados por uma ou mais cristas, e um indumento de folhas curtas e prateadas (MOURA *et al*., 2018). Segundo esses autores, no Brasil, independente da espécie, essas plantas são comumente chamadas de mucuna-preta.

São plantas com grande potencial para alimentação humana e animal, com a presença de compostos fenólicos, flavonoides, açúcares solúveis totais, potássio, magnésio, ferro, zinco, cobre e proteínas (LAMPARIELLO *et al*., 2012; ARIVALAGA *et al*., 2014; CHINAPOLAIAH *et al*., 2019). Além disso, a farinha de suas sementes contém quantidades significativas de aminoácidos essenciais (BALOGUN; OLATIDOYE 2012). A mucuna-preta apresenta propriedades medicinais, sendo amplamente utilizadas para o tratamento da infertilidade masculina, distúrbios nervosos, reumatoide, artrite e diabetes (RAINA; KHATRI 2011; CHINAPOLAIAH *et al*., 2019). Um dos seus principais compostos o L-DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina), um aminoácido não-proteico, tem atraído muita atenção devido à sua ação preventiva contra a doença de Parkinson, caracterizada pela deficiência na síntese do neurotransmissor dopamina nas células nervosas (CASSANI *et al*., 2016; CILIA *et al*., 2018). O L-DOPA também é um precursor essencial na biossíntese da melanina, que está presente em muitos tecidos de animais e plantas (SOARES *et al*., 2014).

Na agricultura, destaca-se como uma planta de cobertura importante por exibir crescimento e desenvolvimento vigoroso, propiciando cobertura plena do solo após 60 dias de seu plantio (TEODORO *et al*., 2011), com produção de biomassa aproximadamente 20 e 30 toneladas ha^{-1} (GARCIA *et al*., 2012). A maioria das

espécies desse gênero apresenta tolerância aos estresses abióticos, incluindo seca, baixa fertilidade e alta acidez do solo (DUKE, 1981). Como a maioria das leguminosas, a mucuna-preta tem o potencial de fixar nitrogênio, controlar pragas, nematoides e plantas daninhas (MARCHIOSI *et al*., 2020). O L-DOPA é o principal composto fitotóxico presente na mucuna-preta e o responsável pela inibição do crescimento de outras plantas (SOARES *et al*., 2014).

Suas características fisiológicas fazem com que a mucuna-preta se sobreponha rapidamente à vegetação, competindo com outros vegetais (BARBOSA *et al*., 2018). Assim, a gestão inadequada ao uso da mucuna-preta, principalmente devido a dormência e a incorporação ao solo das sementes, constituíram um problema dentro do sistema agrícola, fazendo com que essa espécie vegetal se comporte como uma planta daninha (SOUZA *et al*., 2015). Como resultado, a mucuna-preta tornou-se uma importante planta daninha dentro do sistema de produção de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo (SILVA et al., 2013), com potencial de dispersão de sementes para outras áreas ou estados (BRESSANIN *et al*., 2016).

2.3 L-3,4-DIHIDROXIFENILALANINA (L-DOPA)

A via do ácido chiquímico é responsável pela biossíntese da maioria dos compostos fenólicos em plantas. Essa rota é a principal via metabólica na produção dos aminoácidos aromáticos, os quais não são somente utilizados para síntese proteica e enzimática, mas funcionam também como precursores de muitos metabólitos secundários (HERRMANN, 1995). Os aminoácidos aromáticos originam diversas famílias de compostos importantes na regulação do crescimento e na defesa das plantas, como os taninos condensados, vitamina E, ácido indolacético (AIA), ácido salicílico, lignina, antocianinas, flavonas, isoflavonoides, fenilpropanoides e cumarinas, necessários para o crescimento e desenvolvimento vegetal (VELINI *et al*., 2009). Essa via atua diretamente na formação do L-DOPA, pois é resultado da hidroxilação da tirosina pela enzima tirosina hidroxilase contendo cobre na presença de O_2 molecular. Em mamíferos a via de biossíntese do L-DOPA é análoga ao das plantas e precursora de moléculas neurologicamente cruciais, como dopamina, norepinefrina e epinefrina, além de ser precursora na biossíntese de pigmentos como a melanina (SOARES *et al*., 2014; CALABRESI *et al*., 2015; MOSHAROV BORGKVIST; SULZE, 2015; HADDAD *et al*., 2017; MARCHIOSI *et al*., 2020).

O L-DOPA é um dos aleloquímicos naturais mais fortes com efeitos fisiológicos e bioquímicos significativos nas plantas. Segundo Fujii; Shibuya; Yasuda (1991), esse composto, quando presente, é relacionado ao efeito negativo no crescimento de plantas daninhas e culturas. Nishihara *et al*. (2004) revelaram atributos típicos de um aleloquímico após a aplicação desse composto em diferentes plantas. Estes autores observaram ainda respostas diferentes nas plantas expostas ao L-DOPA e concentrações requeridas para ocasionar 50% de inibição (EC50) variaram de 5 a 50 µg mL^{-1}. Estima-se de acordo com o rendimento do peso fresco folhas e caules, que a mucuna-preta pode liberar cerca de 100 a 450 kg ha^{-1} de L-DOPA em solo (FUJII, 1999; GOLISZ *et al*., 2011; SOARES *et al*., 2014).

Efeitos alelopáticos da mucuna-preta e/ou do L-DOPA foram relatados em várias espécies de plantas daninhas e culturas por meio de bioensaios e a campo, sendo sua principal característica reduzir o crescimento de outras plantas (SOARES et al., 2014; MARCHIOSI *et al*., 2020). Em plantas, a fitointoxicação de L-DOPA foi atribuída em grande parte, a sua metabolização provocando danos oxidativos causado por espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas a partir da via de síntese de melanina (HACHINOHE; SUNOHARA; MATSUMOTO, 2004; HACHINOHE; MATSUMOTO, 2005; HACHINOHE; MATSUMOTO, 2007). Além disso, observa-se que para esse o composto há variações nas respostas para determinadas plantas, ou seja, algumas apresentam ou não mais suscetibilidade ao L-DOPA (NISHIHARA *et al*., 2004).

Dessa forma, assume-se que para as plantas menos suscetíveis, estas têm mais capacidade de metabolizar L-DOPA em fenilalanina, tirosina e dopamina, evitando sua oxidação a melanina e a produção de EROs associada. Como consequência, há uma baixa produção de EROs, degradação de proteínas e peroxidação lipídica, e pouca influência sobre o crescimento e desenvolvimento de outras plantas (MARCHIOSI *et al*., 2020). Algumas evidências sugerem que a produção de EROs não é o único fator responsável pela toxicidade da L-DOPA em plantas. Pesquisadores têm associado questões relacionadas a lignina e enzimas envolvidas nesse processo (SOARES *et al*., 2007, SOARES *et al*., 2011, SOARES *et al*., 2012, SIQUEIRA-SOARES *et al*., 2013, BIDO *et al*., 2018), trocas gasosas (MARCHIOSI *et al*., 2016) e absorção de nutrientes e água (MARCHIOSI *et al*., 2020).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Três estudos foram conduzidos no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), pertencente ao Departamento de Proteção de Plantas da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), em Botucatu, São Paulo.

3.1 ESTUDO 1 - POTENCIAL ALELOPÁTICO DA MUCUNA-PRETA UTILIZANDO BIOENSAIOS

Obtenção do material vegetal

Em casa de vegetação foram semeadas entre as profundidades de 1-2 cm três sementes de mucuna-preta em vasos de polietileno 1,8 L preenchidos com substrato organomineral, contendo turfa de sphagno, vermiculita expandida, casca de arroz torrefado, calcário dolomítico, gesso agrícola e traços de NPK; condutividade elétrica (CE) = 0,7 ± 0,3 $mScm^{-1}$; pH em água ou KCl 5,5 ± 0,5; densidade das partículas 155 kg m^{-3}; capacidade de retenção de água 55%. Após a emergência, foi realizado o desbaste, mantendo-se uma planta por unidade experimental e a irrigação foi realizada sempre que necessário visando manter a umidade necessária para o desenvolvimento das plantas. Aos 45 dias após a emergência (Figura 1), realizou-se a coleta das folhas, caules e raízes para a realização dos experimentos pelo método do extrato aquoso (Experimento 1) e sanduíche (Experimento 2).

Figura 1 - Planta da mucuna-preta utilizada nos experimentos

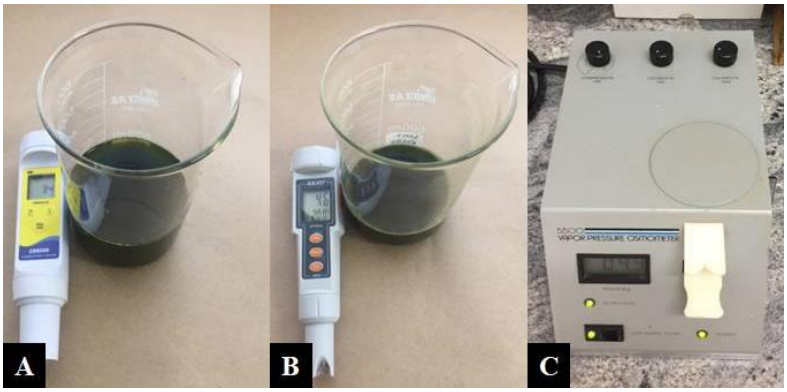
Fonte: Roque de Carvalho Dias

3.1.1 Método do extrato aquoso

Com o intuito de avaliar o potencial alelopático por meio aquoso das diferentes partes da planta da mucuna-preta em diferentes concentrações, os materiais frescos foram divididos em folhas, caules e raízes, lavados, pesados em balança analítica, picados e em seguida triturados com auxílio de um liquidificador industrial. Todos os extratos foram feitos obedecendo à proporção de 100 g de material vegetal com 1000 mL de água destilada, sendo essa considerada a solução padrão (100% de concentração). A partir desta, foram feitas diluições com água deionizada para 75, 50 e 25%. O efeito destas quatro concentrações foi comparado com o da água destilada, considerada como controle (0%).

Em todas as concentrações dos extratos, foram mensurados a condutividade elétrica, pH e osmolalidade, utilizando-se condutivímetro portátil digital CON-300, pHmetro portátil digital AK90 e osmômetro Wescor (modelo 5500), respectivamente (Figura 2).

Figura 2 - Condutivímetro (A), pHmetro (B) e osmômetro (C) utilizado nas avaliações dos extratos aquosos.



Fonte: Roque de Carvalho Dias

Os ensaios de germinação foram realizados em câmara do tipo BOD com fotoperíodo 12/12 horas de luz/escuro a 25°C para alface (BRASIL, 2009). Os testes foram feitos em caixas acrílicas tipo gerbox (11 x 11 x 3,5 cm), contendo como substrato duas folhas de papel germitest. Em cada gerbox foram adicionadas as soluções aquosas na quantidade de 2,5 vezes o peso inicial do papel para as diferentes concentrações e água deionizada para o tratamento controle (BRASIL, 2009), seguido pela distribuição de 50 sementes de alface cv. Grand rapids (*Lactuca*

sativa L.). Portanto, o experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado composto por cinco tratamentos (concentrações do extrato de 0, 25, 50, 75 e 100%) e quatro repetições, totalizando 200 aquênios por tratamento (Figura 3). Após 7 dias da instalação do teste, foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram no mínimo 2 mm de protrusão da radícula (RIBEIRO *et al*., 2019). A primeira contagem (PC) do teste de germinação, utilizada como parâmetro de vigor, foi efetuada em conjunto com o procedimento anterior, computando-se a porcentagem de sementes com protrusão radicular obtidas no quarto dia após o início do teste (BRASIL, 2009).

Para avaliar a velocidade de germinação, avaliou-se o tempo médio para ocorrência de 50% de germinação (T50) em dias (SHIPLEY; PARENT, 1991), calculado através dos dados acumulativos de germinação ao longo dos sete dias e o índice de velocidade de germinação (IVG) empregando-se a fórmula proposta por Nakagawa (1994):

$$IVG = G1 / N1 + G2 / N2 + ... Gn / Nn$$

Em que IVG = índice velocidade de germinação; G1, G2 e Gn = número de plântulas normais germinadas a cada dia; N1, N2, ...Nn = número de dias decorridos da semeadura a primeira, segunda e última contagem.

De acordo com Gao *et al*. (2009), foi avaliado o Índice de Efeito Alelopático (RI), de acordo com a seguinte fórmula:

$$RI = 1 – C/T \ (T \geq C) \text{ ou } RI = T/C – 1 \ (T < C)$$

Em que C = velocidade de germinação do controle; T = velocidade de germinação do tratamento.

Para a Velocidade de Germinação, usou-se:

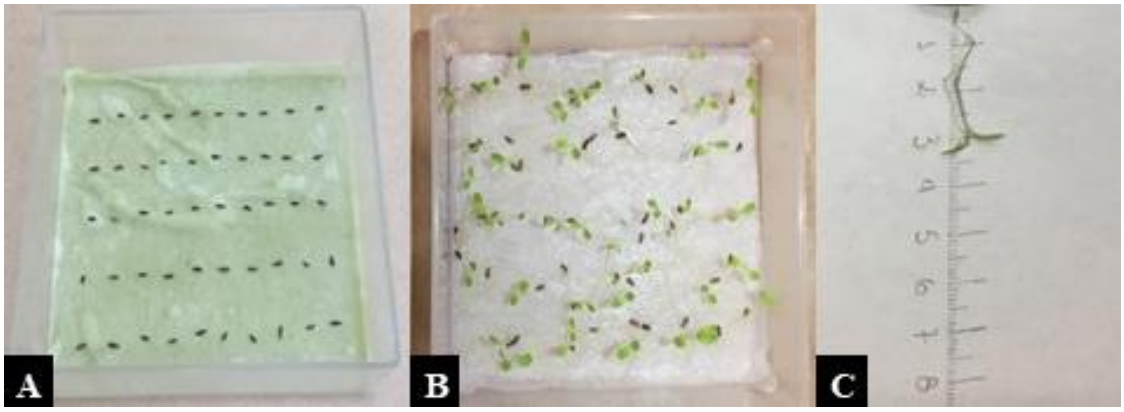
$$VG\ (\%) = \Sigma\ (Gt/D) / \Sigma\ (Gc/Dx100)$$

Em que Gt = número de sementes germinadas diariamente do tratamento; Gc = número de sementes germinadas diariamente do controle; D = número de dias correspondente.

Ao final do teste de germinação, as plântulas normais que apresentaram no mínimo 2 mm de protrusão da radícula, foram mensuradas quanto ao comprimento da parte aérea e raiz (cm) (Figura 3). Após as medidas biométricas, as plântulas de cada repetição foram acondicionadas em papel alumínio e mantidas em estufa a 80ºC durante 48 horas até a estabilização do peso. Decorrido este período, o material

vegetal foi pesado em balança analítica de precisão, obtendo-se assim os valores de biomassa seca total das plântulas (mg).

Figura 3 - Sementes de alface no início (A) e final (B) do ensaio e a avaliação do comprimento da parte aérea e raiz (mm) da plântula (C).



Fonte: Roque de Carvalho Dias

Visando determinar a influência do potencial osmótico dos extratos da mucuna-preta estudados na germinação da espécie receptora, foi realizado um bioensaio em soluções de polietilenoglicol (PEG-6000). Para isso, foram realizados cálculos a partir dos valores de osmolalidade obtidos para cada extrato de acordo Villela, Doni Filho e Sequeira (1991) e utilizou-se a mesma metodologia descrita para os bioensaios realizados com os extratos da mucuna-preta.

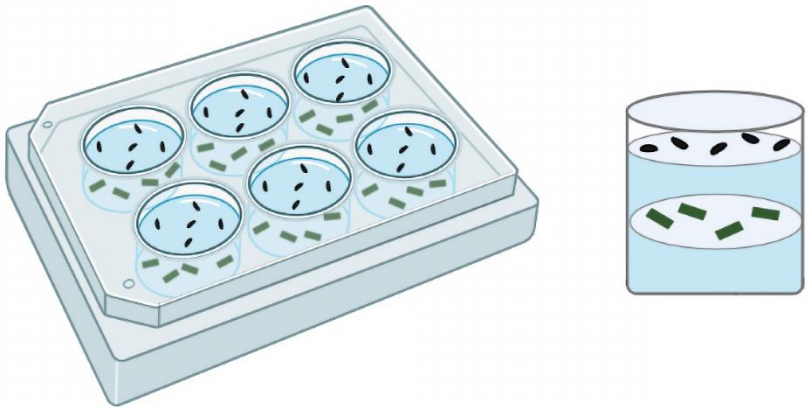
3.1.2 Método sanduíche

No sentido de constatar se os lixiviados da planta de mucuna-preta apresentam potencial alelopático, os bioensaios foram realizados com as folhas, caules e raízes da planta. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em placas para cultura de tecidos com seis poços de 10 cm^2 de área e volume de 10 mL (Kasvi) e cada poço representou uma repetição. Para isso, 5 mL de solução de ágar (0,5%) com gelificação 30-31ºC, autoclavada durante 15 minutos a 115ºC, foram dispensados em cada poço das placas. Posteriormente, adicionou-se 10, 20, 40 e 80 mg (100, 200, 400, 800 kg ha^{-1}) de biomassa fresca de cada parte da planta seguindo-se a adição de 5 mL de ágar na parte superior da primeira camada. Não houve adição de material vegetal no ágar para o tratamento controle. Em seguida, semeou-se cinco

sementes de alface cv. Grand rapids (*Lactuca sativa* L.) em cada poço (Figura 4 e 5). As placas foram mantidas em câmara de germinação sob condições de umidade e temperatura (20ºC) constantes e em ausência de luz (FUJJI, 2003; FUJJI *et al*., 2004).

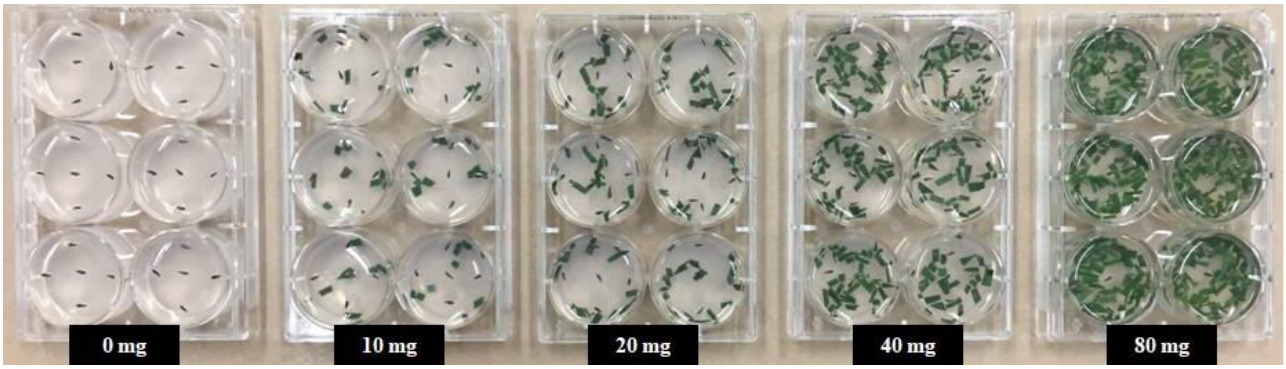
Após quatro dias, avaliou-se a porcentagem de germinação e comprimento da parte aérea e raiz (cm) das plântulas, seguindo os mesmos parâmetros utilizados no ensaio do extrato aquoso.

Figura 4 - Esquema do método sanduíche com diferentes concentrações das folhas, caules e raízes da mucuna-preta.



Fonte: Roque de Carvalho Dias

Figura 5 - Método sanduíche com diferentes concentrações de folhas da mucuna-preta.



Fonte: Roque de Carvalho Dias

3.1.3 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F e quando significativo as médias dos tratamentos foram comparados pelo teste

de Tukey, ambos a 5% de probabilidade. Os gráficos foram elaborados com auxílio do programa Sigmaplot 12.5 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA).

3.2 ESTUDO 2 - ALELOPATIA DA MUCUNA-PRETA EM MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Foram realizados dois experimentos em casa-de-vegetação nos meses de abril-setembro de 2019 e agosto 2020 - janeiro 2021. As unidades experimentais foram constituídas por vasos plásticos com capacidade para 11 dm^3 (diâmetro: 27 cm e altura: 24 cm) preenchidos com solo coletado da camada arável em uma área em pousio, na profundidade de 0-20 cm de um Latossolo Vermelho distroférrico (EMBRAPA, 2013), de textura média. A adubação de base foi constituída com 250 kg ha^{-1} de NPK (16-16-16) e após 30 dias realizou-se a coleta de solo que apresentou a seguinte análise físico-química (Tabela 1).

Tabela 1 - Características físico-químicas do Latossolo Vermelho distroférrico de textura média utilizado no experimento.

pH	M.O.	P_{resina}	Al^{3+}	$H^{+}+Al^{3+}$	$Ca^{2+}+Mg^{2+}$	Ca^{2+}	K^{+}	CTC	V
($CaCl_2$)	(g dm^{-3})	(mg dm^{-3})	---------- ($mmol_c$ dm^{-3}) ----------					($mmol_c$ dm^{-3})	(%)
5,3	14,00	171,00	0,00	12,00	48,00	31,00	0,42	98,00	73,00
S	B	Cu	Fe	Mn	Zn		Areia	Silte	Argila
---------- mg dm^{-3}----------							---------- (g kg^{-1}) -----		
15,00	1,82	1,7	6,00	1,0	6,0		644	47	309

M.O.: matéria orgânica; CTC: capacidade de troca de cátions; V: saturação por base.

O experimento foi composto por quatro tratamentos, correspondendo a 0, 2, 4 e 8 plantas de mucuna-preta por vaso (T1, T2, T3 e T4) em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições. As sementes de mucuna-preta foram previamente semeadas em bandejas e quando as plântulas uniformes apresentavam duas folhas completamente expandidas foram transplantadas para os vasos, visando bom estabelecimento das populações desejadas. Posteriormente, as plantas foram cultivadas até aos 30 dias após a emergência (30 DAE) em casa de vegetação, sendo

a irrigação realizada sempre que necessário visando manter a umidade adequada para o desenvolvimento das plantas. Após esse período, houve a remoção total das plantas e dos restos vegetais, seguido do transplantio de duas mudas pré-brotada (MPB) de cana-de-açúcar (RB85 5156) por vaso. Antes do transplantio das MPB e após o término das avaliações, coletou-se amostras de solo de cada unidade experimental e através de uma amostra composta de ambos os experimentos (duplicata experimental) foi realizada a análise química.

As avaliações nas MPB iniciaram-se aos 21 dias após o transplantio (DAT), tempo suficiente para que as mudas pudessem se estabelecer. Assim, aos 21, 28, 35, 42, 49, 56 e 63 DAT avaliou-se a altura, diâmetro e perfilhamento das MPB. Para a altura (distância do coleto a inserção da última folha expandida) foi realizada com auxílio de uma régua graduada em milímetros, o diâmetro foi medido com um paquímetro (junto ao colo da muda) e perfilhamento pela contagem do número de perfilhos em cada planta. O crescimento em altura e diâmetro foram obtidos pela diferença entre o comprimento da muda no transplantio e em cada período de avaliação para cada repetição em cada tratamento.

Aos 21, 42 e 63 DAT realizou-se medições de trocas gasosas na primeira folha da planta com a lígula visível de cada MPB por vaso. A taxa de assimilação líquida de CO_2 (*A*, µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}) concentração interna de CO_2 na folha (*Ci*, µmol mol^{-1}), taxa de transpiração (*E*, mmol H_2O m^2 s^{-1}) e condutância estomática (*gs*, mol m^{-2} s^{-1}), foram avaliadas utilizando um analisador de gases no infravermelho IRGA LCrop-SD (ADC Bioscientific Ldt, RU) configurado com um compensador de luz com radiação ativa de 1500 µmol m^{-2} s^1 (Figura 6). A eficiência do uso de água (*EUA*, mmol CO_2 H_20 m^{-2} s^{-1}) foi determinada através da relação entre assimilação de CO_2 e taxa de transpiração e a eficiência de carboxilação (*A*/*Ci*, mol CO_2 m^{-2} s^{-1}) foi calculada através da relação entre a taxa de assimilação de CO_2 e concentração interna de CO_2 na folha.

Figura 6 - Análises de trocas gasosas em folhas de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar transplantadas em solo previamente cultivado com diferentes densidades de mucuna-preta.

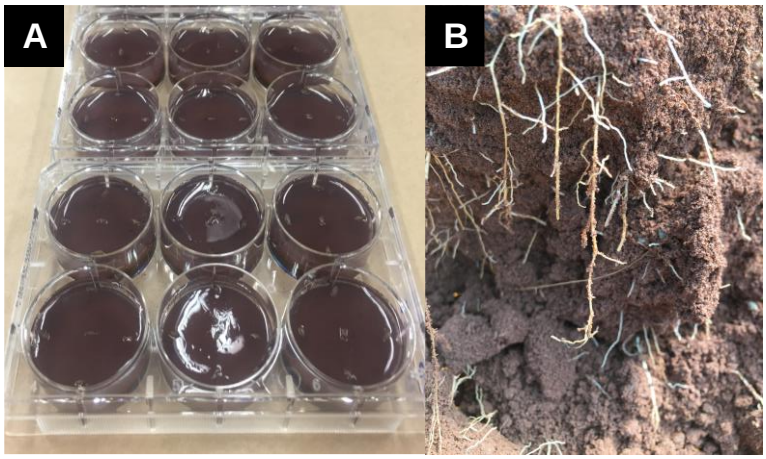
Fonte: Roque de Carvalho Dias

Ao final do experimento (63 DAT) foi avaliado a biomassa seca da parte aérea e das raízes das mudas de MPB. Para isso, a parte aérea foi cortada rente à superfície do solo e o sistema radicular foi separado e lavado em água corrente até a limpeza completa. Os materiais coletados foram posteriormente acondicionados em sacos de papel e submetidos a secagem em estufa com circulação forçada de ar com temperatura de 65 °C e, depois de secos, pesados em balança analítica de precisão.

Também foi avaliado a alelopatia nas raízes da mucuna-preta, seguindo o método de análise do solo da rizosfera (FUJII; FURUBAYASHI; HIRADATE, 2005). Para isso, duas plantas de mucuna-preta foram mantidas nas condições descritas anteriormente e aos 30 DAE durante a remoção das plantas, suas raízes foram agitadas suavemente para a coleta do solo aderente. O solo de rizosfera foi acondicionado em placas para cultura de tecidos com seis poços de 10 cm^2 de área e volume de 10 mL (Kasvi), totalizando seis repetições por tratamento (Figura 7). Após essa etapa, 5 mL de solução de ágar (0,5%) com gelificação 30-31ºC, autoclavada durante 15 minutos a 115ºC, foram dispensadas em cada poço das placas e após a solidificação, adicionou-se 3,2 mL de ágar na parte superior da primeira camada. Cinco sementes de alface cv. Grand rapids (*Lactuca sativa* L.) foram colocadas em cada poço e mantidas em câmara de germinação sob condições de umidade e

temperatura (20ºC) constantes e em ausência de luz, conforme descrito no primeiro estudo. O ensaio foi composto de dois tratamentos, solo na ausência e presença da rizosfera da mucuna-preta. O comprimento das raízes e parte aérea das plântulas de alface foram medidos quatro dias após a início do bioensaio.

Figura 7 - Método sanduíche de análise alelopática (A) pelo solo da rizosfera de plantas de mucuna-preta (B).



Fonte: Roque de Carvalho Dias

3.2.1 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F. Para as MPB de cana-de-açúcar foi realizada uma análise conjunta das duas épocas de condução dos experimentos e, quando significativos, foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As variáveis crescimento em altura, diâmetro e biomassa seca da parte aérea e raiz foram expressos em porcentagem em relação à testemunha. Já para o método de análise do solo da rizosfera foi utilizado o teste de t de Student. Os gráficos foram elaborados com auxílio do programa Sigmaplot 12.5 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA).

3.3 ESTUDO 3 - TROCAS GASOSAS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM PLANTAS DE CAPIM-BRAQUIÁRIA (*UROCHLOA DECUMBENS*) EXPOSTAS AO L-DOPA

3.3.1 Efeito de aplicação foliar de L-DOPA no crescimento

Foram realizados dois experimentos de curva de dose-resposta em casa de vegetação, cada um repetido duas vezes, no intuito de verificar qual a concentração mínima responsável por afetar o crescimento das plantas de capim-braquiária. Para isso, foram semeadas aproximadamente 1,00 g de sementes de capim-braquiária em unidades experimentais constituídas por bandejas de polipropileno compostas por células com capacidade de 120 mL preenchidas com substrato organomineral, contendo turfa de sphagno, vermiculita expandida, casca de arroz torrefado, calcário dolomítico, gesso agrícola e traços de NPK; condutividade elétrica (CE) = 0,7 ± 0,3 $mScm^{-1}$; pH em água ou KCl 5,5 ± 0,5; densidade das partículas 155 kg m^{-3}; capacidade de retenção de água 55%. Após a emergência, foi realizado o desbaste, mantendo-se uma planta por unidade experimental e a irrigação realizada sempre que necessário visando manter a umidade necessária para o desenvolvimento das plantas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com seis repetições. As doses utilizadas do L-DOPA (mg L^{-1}) foram: 0, 0,0156, 0,0312, 0,0625, 0,0125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 (primeiro experimento) e 0, 8, 16 e 32 (segundo experimento). A calda de aplicação foi preparada adicionando-se o espalhante adesivo Tween 20 (0,01%) em todos os tratamentos e as plantas de capim-braquiária apresentavam três folhas. O L-DOPA e o Tween 20 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Para a aplicação foi utilizado um pulverizador automatizado instalado em ambiente fechado, provido de uma barra de pulverização com quatro pontas TeeJet Extended Range (XR 110.02 VS), espaçadas entre si em 0,5 m e posicionadas a 0,5 m de altura em relação à superfície dos vasos. O sistema foi operado através de um motor elétrico, que possui um modulador de frequência, sendo utilizada uma velocidade de deslocamento de 3,6 km h^{-1}, com volume de calda de 200 L ha^{-1}, pressão constante de 150 kPa, pressurizado por ar comprimido.

Aos 21 dias após a aplicação (DAA), as plantas foram avaliadas após serem removidas e lavadas em água corrente para remoção do substrato, quanto ao comprimento da raiz e parte aérea com o auxílio de uma régua graduada (cm), além da biomassa seca (g) obtida pela pesagem dos materiais vegetais após serem acondicionados em sacos de papel kraft, levados em estufa com circulação de ar a 65ºC por 48h. Todos os dados foram expressos em porcentagem da testemunha (dose: 0 mg L^{-1} de L-DOPA).

3.3.2 Efeito de aplicação foliar de L-DOPA nas trocas gasosas

Foi conduzido um experimento visando avaliar a efeito das doses de L-DOPA selecionados nas curvas de dose resposta anteriores (3.3.1) nas trocas gasosas de capim-braquiária. Assim, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e as doses corresponderam a 0, 8, 16 e 32 mg L^{-1} de L-DOPA com cinco repetições. As unidades experimentais foram compostas por vasos de polietileno 1,8 L e o substrato comercial, quantidade de sementes, aplicação do L-DOPA e condições de cultivo foram semelhantes as utilizadas no primeiro estudo (3.3.1). A aplicação ocorreu aproximadamente após 20 dias da emergência das plantas quando estas apresentavam cerca de 20 cm de altura.

Aos 3, 7, 14 e 21 dias após a aplicação (DAA) do L-DOPA realizou-se as medições de trocas gasosas na primeira folha recém expandida de um perfilho escolhido ao acaso de cada vaso. A taxa de assimilação líquida de CO_2 (*A*, µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}), concentração interna de CO_2 na folha (*Ci*, µmol mol^{-1}), taxa de transpiração (*E*, mmol H_2O m^2 s^{-1}), condutância estomática (*gs*, mol m^{-2} s^{-1}), foram avaliadas utilizando um analisador de gases no infravermelho IRGA LCrop-SD (ADC Bioscientific Ldt, UK) configurado com um compensador de luz com radiação ativa de 1500 µmol m^{-2} s^1. Já a eficiência do uso de água (*EUA*, mmol CO_2 H_20 m^{-2} s^{-1}) foi determinada através da relação entre assimilação de CO_2 e taxa de transpiração e a eficiência de carboxilação (*A*/*Ci*, mol CO_2 m^{-2} s^{-1}) foi determinada por meio da relação entre a taxa de assimilação de CO_2 e concentração interna de CO_2 na folha.

Ao final do experimento (21 DAA) foi avaliada a biomassa seca da parte aérea, para isso, a parte aérea foi cortada rente à superfície do solo, acondicionados em sacos de papel e submetidas a secagem e pesagem conforme descrito no estudo

primeiro estudo. Os dados foram expressos em porcentagem da testemunha (dose: 0 mg L^{-1} de L-DOPA).

3.3.3 Efeito do L-DOPA aplicado via solução nutritiva na atividade enzimática

As sementes de capim-braquiária foram esterilizadas com solução de hipoclorito de sódio a 2% por cinco minutos e enxaguadas com água deionizada. Em seguida, foram germinadas na câmara de crescimento do tipo BOD, em temperatura alternada de 25-35°C e sob fotoperíodo de 8 horas de luz e 16 horas de escuro em duas folhas de papel germitest filtro umedecido (BRASIL, 2009). Após 15 dias da semeadura, 155 plântulas contendo aproximadamente uma a duas folhas foram transferidas para caixas acrílicas tipo gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) com uma tela de separação da parte aérea das raízes preenchidas com 150 mL de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950).

Após uma semana adicionou-se o L-DOPA nas doses de 0, 8, 16 e 32 mg L^{-1} na solução nutritiva, totalizando-se quatro tratamentos conduzidos com cinco repetições e em delineamento inteiramente casualizado. Os recipientes foram mantidos na câmara de crescimento por cinco dias e após essa etapa, coletou-se cinco plântulas por repetição para as avaliações de comprimento e biomassa seca da raiz e parte aérea conforme descrito no estudo 3.3.1. Os dados foram expressos em porcentagem da testemunha (dose: 0 mg L^{-1} de L-DOPA).

Para o restante das plântulas de capim-braquiária houve a separação das amostras da parte aérea e raiz da planta para a determinação da atividade enzimática do sistema antioxidativo: superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1), catalase (CAT – E.C 1.11.1.6) e peroxidase (POD – EC 1.11.1.7). A quantificação da atividade enzimática foi realizada segundo metodologia proposta por Kar e Mishra (1976). Para isso, foi utilizado 300 mg da parte aérea e raiz de capim-braquiária, as quais foram macerados em nitrogênio líquido. Em seguida, homogeneizou-se o material vegetal em 4 mL de tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 6,8) gelado, suplementado com 200 mg de Polivinil-polipirrolidona (PVPP). Essa solução foi centrifugada a 10000 x g por 10 minutos a 4°C. O extrato obtido foi separado em microtubos e armazenado a -20°C para posterior determinação.

A atividade da SOD foi determinada de acordo com metodologia proposta por Beauchamp e Fridovich (1971), onde a atividade da SOD considera a capacidade da

enzima em inibir a fotorredução do NBT (Azul de nitrotetrazólio cloreto). O sistema de reação foi preparado na ausência de luz direta e foi composto por 50 µL de extrato enzimático e 2950 µL de solução tampão fosfato de potássio (50 mmol L^{-1}, pH 7,8) + metionina (13 mmol L^{-1}) + cloreto de azul de pnitrotetrazólio (NBT, 75 µmol L^{-1}) + riboflavina (2 µmol L^{-1}) + EDTA (100 nmol L^{-1}), totalizando um volume final de 3000 µL. A reação foi conduzida à temperatura ambiente sob iluminação direta por 5 minutos. O composto azul formado (formazana) pela fotorredução do NBT foi determinado pela leitura em espectrofotômetro a 560 nm. Uma unidade de SOD (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir, em 50%, a fotorredução do NBT e a atividade específica da enzima foi expressa em U min^{-1} g^{-1} de proteína.

A atividade da CAT foi determinada em espectrofotômetro (240 nm) pelo monitoramento da variação da absorção do peróxido de hidrogênio, conforme Peixoto *et al*. (1999). O sistema de reação foi composto por 100 µL de extrato enzimático e 1900 µL de solução tampão fosfato de potássio (50 mmol L^{-1}, pH 7,0) suplementado com peróxido de hidrogênio (H_2O_2, 12,5 mmol L^{-1}), totalizando volume final de 2000 µL. A variação da absorção foi calculada em um intervalo de 80 s, a fim de verificar quanto decréscimo ocorreu na absorbância. Para calcular a atividade específica da enzima, foi utilizado o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 (39,4 mmol L^{-1} cm^{-1}) e a atividade foi expressa em nmol de H_2O_2 consumido min^{-1} g^{-1} proteína.

A atividade da POD total foi determinada de acordo com metodologia proposta por Teisseire e Guy (2000). O sistema de reação foi composto por 30 µL de extrato enzimático, 500 µL de tampão fosfato de potássio (50 mmol L^{-1}, pH 6,5), 250 µL de pirogalol (1,2,3-benzenotriol 20 mmol L^{-1}) e 220 µL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 5 mmol L^{-1}, totalizando um volume final de 1000 µL. A reação foi conduzida à temperatura ambiente por 5 minutos. A formação de purpurogalina foi medida em espectrofotômetro a 430 nm. Para calcular a atividade específica da enzima foi usado o seu coeficiente de extinção molar (2,47 mmol L^{-1} cm^{-1}) e a atividade foi expressa em µmol de purpurogalina min^{-1} g^{-1} de proteína.

3.3.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e quando significativos as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Nos experimentos 3.3.1 e 3.3.2 foi realizada uma

análise conjunta da duplicata experimental (Apêndice B) e os resultados apresentados representam a média de dois experimentos. Os gráficos foram elaborados com auxílio do programa Sigmaplot 12.5 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO 1 - POTENCIAL ALELOPÁTICO DA MUCUNA-PRETA UTILIZANDO BIOENSAIOS

4.1.1 Resultados - Método do extrato aquoso

A caracterização dos extratos da raiz, caule e folha da mucuna-preta segundo as análises físico-químicas mostrou que a condutividade elétrica, pH e osmolalidade variaram entre 5,35 a 7,12, 2,18 a 14,51 e 36 a 58, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Características físico-químicas dos extratos aquosos da raiz, caule e folha da mucuna-preta.

Concentração de extrato (%)	Condutividade elétrica ($\mu S\ cm^{-1}$)	pH	Osmolalidade ($mmol\ kg^{-1}$)
Raiz			
0 - Controle	2,18	7,12	0
25	4,62	6,09	42
50	8,75	5,82	45
75	11,30	5,57	48
100	14,51	5,35	51
Caule			
0 - Controle	2,18	7,12	0
25	4,81	6,20	44
50	7,09	6,11	48
75	10,32	5,97	53
100	13,20	5,84	58
Folha			
0 - Controle	2,18	7,12	0
25	4,03	6,50	36
50	5,85	6,28	43
75	8,47	6,00	48
100	11,10	5,91	52

As soluções de polietilenoglicol (PEG 6000) referentes as concentrações dos extratos nas diferentes partes da mucuna-preta não influenciaram na germinação, vigor e desenvolvimento das plântulas de alface (Tabela 3 e 4), desconsiderando-se assim, a possibilidade de possíveis interferências de natureza osmótica dos extratos sobre a alface.

Tabela 3 - Germinação (%), primeira contagem (PC), tempo médio para ocorrência de 50% de germinação (T50) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a diferentes concentrações de soluções de polietilenoglicol (PEG 6000) com osmolalidade similar aos extratos estudados.

Osmolalidade (mmol kg^{-1})	**Germinação (%)**	**PC**	**T50**	**IVG**
Raiz				
0 – Controle	96,50 ± 0,28	96,91 ± 1,05	1,56 ± 0,02	41,56 ± 1,16
42	96,75 ± 0,47	92,36 ± 4,24	1,85 ± 0,06	40,33 ± 1,33
45	97,00 ± 0,40	89,21 ± 3,39	1,92 ± 0,08	38,56 ± 1,22
48	96,00 ± 0,40	88,49 ± 0,74	1,76 ± 0,01	38,76 ± 0,98
51	97,50 ± 0,50	91,90 ± 2,21	1,95 ± 0,10	38,15 ± 1,69
Caule				
0 – Controle	96,75 ± 0,62	93,27 ± 2,11	1,61 ± 0,01	44,30 ± 0,72
44	95,75 ± 0,25	90,74 ± 3,18	1,64 ± 0,06	42,56 ± 2,31
48	97,00 ± 0,57	91,75 ± 1,87	1,72 ± 0,03	41,89 ± 1,02
53	96,50 ± 0,50	90,02 ± 2,87	1,80 ± 0,01	37,25 ± 2,31
58	97,00 ± 0,57	90,27 ± 3,68	1,82 ± 0,02	38,16 ± 1,02
Folha				
0 – Controle	97,25 ± 0,25	90,12 ± 1,31	1,80 ± 0,03	38,89 ± 0,64
36	96, 25 ± 0,47	92,37 ± 2,03	1,65 ± 0,02	44,48 ± 0,84
43	97,25 ± 0,25	88,18 ± 3,76	1,80 ± 0,07	40,19 ± 1,45
48	97,50 ± 0,28	90,61 ± 1,25	1,91 ± 0,05	39,26 ± 0,66
52	96,23 ± 0,47	93,76 ± 2,23	1,77 ± 0,08	41,66 ± 1,95
Partes da planta (A)	$2,36^{ns}$	$0,11^{ns}$	$1,53^{ns}$	$2,33^{ns}$
Concentração (B)	$0,59^{ns}$	$1,13^{ns}$	$2,37^{ns}$	$1,64^{ns}$
A x B	$1,67^{ns}$	$0,70^{ns}$	$1,25^{ns}$	$1,24^{ns}$
C.V. (%)	1,71	5,73	7,15	6,63

ns: letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média ± erro padrão (n=4).

Tabela 4 - Comprimento (mm) da raiz, parte aérea e biomassa seca total das plântulas (g) de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a diferentes concentrações de soluções de polietilenoglicol (PEG 6000) com osmolalidade similar aos extratos estudados.

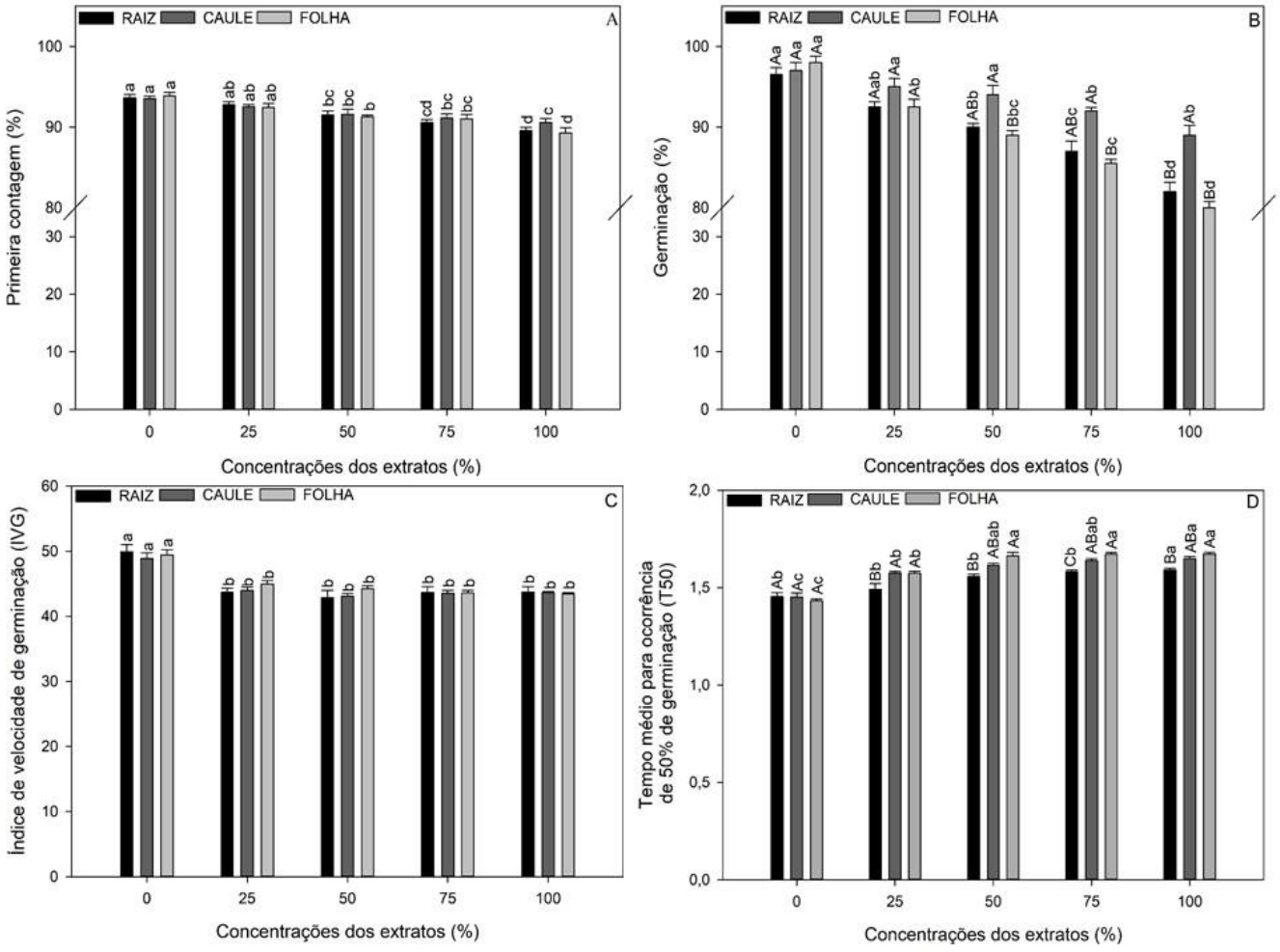
Osmolalidade (mmol kg^{-1})	**Comprimento da raiz (mm)**	**Comprimento da parte aérea (mm)**	**Biomassa seca (g)**
Raiz			
0 – Controle	0,85 ± 0,01	0,87 ± 0,01	0,0388 ± 0,001
42	0,82 ±0,02	0,89 ± 0,02	0,0399 ± 0,001
45	0,86 ± 0,01	0,86 ± 0,05	0,0390 ± 0,001
48	0,89 ± 0,01	0,85 ± 0,03	0,0389 ± 0,002
51	0,83 ± 0,01	0,87 ± 0,01	0,0386 ± 0,002
Caule			
0 – Controle	0,88 ± 0,01	0,90 ± 0,01	0,0399 ± 0,001
44	0,84 ± 0,02	0,88 ± 0,02	0,0379 ± 0,003
48	0,85 ± 0,02	0,87 ± 0,01	0,0396 ± 0,002
53	0,86 ± 0,02	0,89 ± 0,02	0,0384 ± 0,002
58	0,80 ± 0,04	0,87 ± 0,03	0,0389 ± 0,003
Folha			
0 – Controle	0,86 ± 0,01	0,86 ± 0,02	0,0389 ± 0,002
36	0,84 ± 0,02	0,88 ± 0,01	0,0383 ± 0,003
43	0,84 ± 0,02	0,85 ± 0,02	0,0371 ± 0,001
48	0,89 ± 0,03	0,83 ± 0,04	0,0392 ± 0,002
52	0,84 ± 0,01	0,86 ± 0,01	0,0371 ± 0,002
Partes da planta (A)	$3,22^{ns}$	$1,40^{ns}$	$0,26^{ns}$
Concentração (B)	$0,13^{ns}$	$0,6^{ns}$	$0,08^{ns}$
A x B	$0,61^{ns}$	$0,1^{ns}$	$0,16^{ns}$
C.V. (%)	5,17	5,96	11,31

ns: letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Média ± erro padrão (n=4).

Os efeitos dos extratos aquosos da mucuna-preta afetaram a germinação e vigor das sementes de alface (Figura 8). Em germinação (%G), tempo médio para

ocorrência de 50% de germinação (T50), índice de efeito alelopático (RI), comprimento da raiz e parte aérea e biomassa seca das plântulas verificou-se interação significativa das partes da planta da mucuna-preta (raiz, caule e folha) x concentração do extrato (0, 25, 50, 75 e 100%) (Figura 8, 9, 10 e 11). Além disso, notou-se que o aumento da concentração do extrato resultou na intensificação do efeito inibitório, quando as folhas da planta foram utilizadas.

Figura 8 - Primeira contagem (PC) - (A), germinação (%) - (B), índice de velocidade de germinação (IVG) - (C) e tempo médio para ocorrência de 50% de germinação (T50) - (D) de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a diferentes concentrações (%) de extrato aquoso da raiz, caule e folha da mucuna-preta.



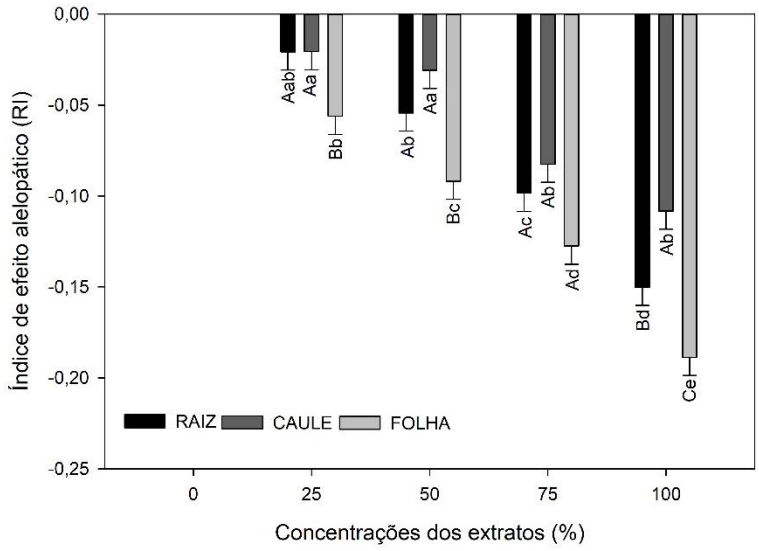
*Barras correspondem ao erro padrão (n=4). Médias seguidas por mesma letra maiúscula para as diferentes partes da planta (raiz, caule e folha) e minúscula para as concentrações (0, 25, 50, 75 e 100%) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade.

Os extratos aquosos das folhas e raízes da mucuna-preta a partir da primeira concentração (25%) influenciaram negativamente nos valores de germinação e T50 das sementes de alface, enquanto para o caule, esse efeito ocorreu em 50 e 75% do extrato, respectivamente para essas duas avaliações. A redução da germinação na última concentração (100%) dos extratos foi de 15, 10 e 18%, e para o T50 houve aumento do tempo para germinação de 9, 13 e 16% em relação ao tratamento controle, para raiz, caule e folha, respectivamente (Figura 8B e D).

Em primeira contagem (PC) e índice de velocidade de germinação (IVG) notou-se diferença significativa apenas no fator concentração quando comparado ao tratamento controle (Figura 8A e C).

O índice de efeito alelopático (RI) pode apresentar valores positivos em relação ao controle quando ocorre estímulo e valores negativos quando há inibição. No presente estudo, pode-se observar que todas as concentrações testadas, independente da parte da planta utilizada, inibiram a germinação das sementes de alface, sendo os efeitos proporcionais ao aumento das concentrações. Além disso, nota-se que os efeitos são mais intensos com o uso das folhas seguido do caule e raíz (Figura 9).

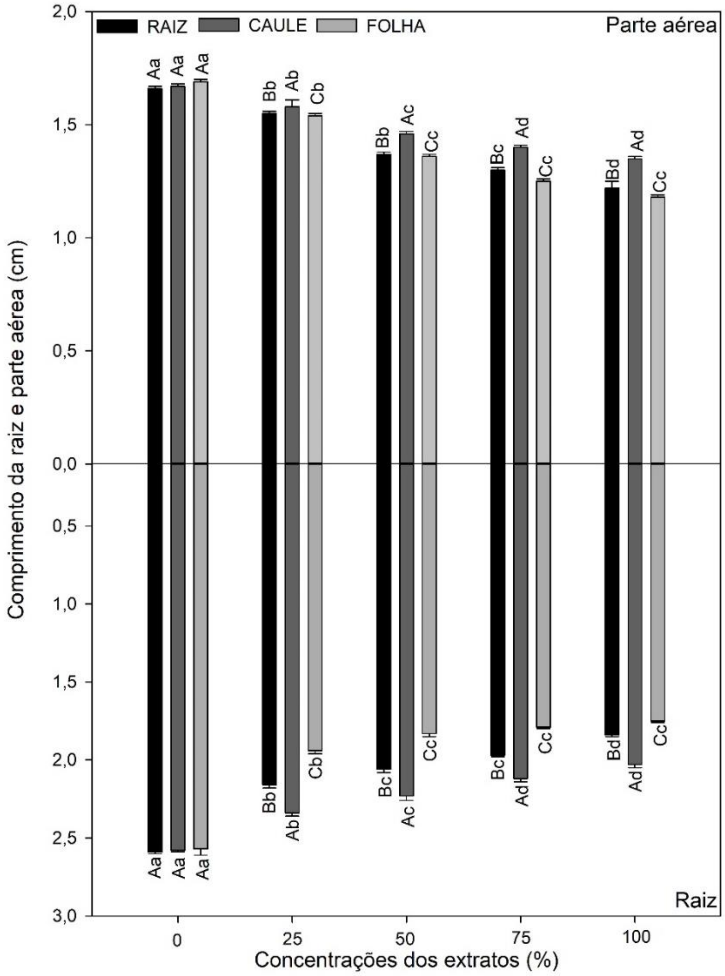
Figura 9 - Índice de efeito alelopático (RI) de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a diferentes concentrações (%) de extrato aquoso da raiz, caule e folha da mucuna-preta.



*Barras correspondem ao erro padrão (n=4). Médias seguidas por mesma letra maiúscula para as diferentes partes da planta (raiz, caule e folha) e minúscula para as concentrações (0, 25, 50, 75 e 100%) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade.

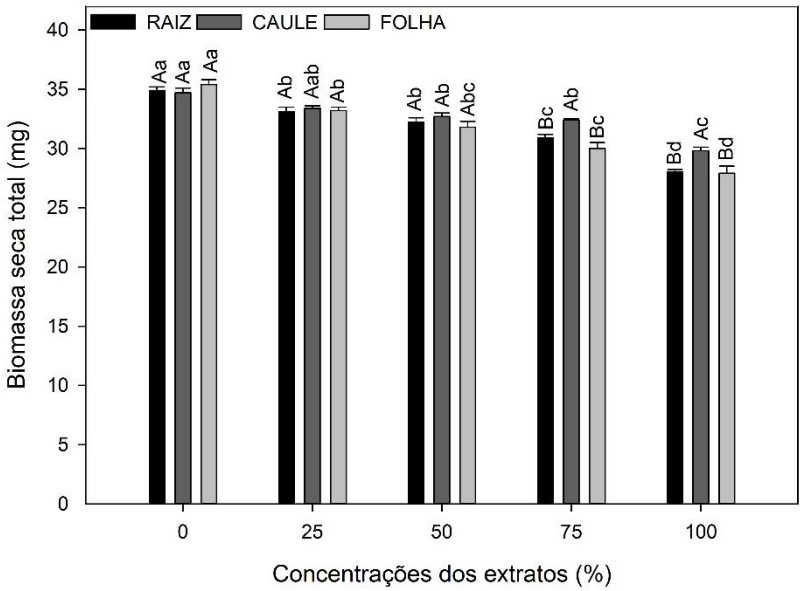
O efeito dos extratos da mucuna-preta sobre o crescimento de alface resultou na interação significativa para os parâmetros estudados: comprimento da raiz e parte aérea e biomassa seca total (Figura 10 e 11). Em todas as avaliações, com o aumento da concentração dos extratos ocorreu a redução das raízes, parte aérea e biomassa seca total. Esse efeito foi maior quando foi utilizado as folhas da mucuna-preta. As maiores reduções no comprimento radicular foram 28, 21 e 31% e para a parte aérea 26, 19 e 30% para 100% da concentração da raiz, caule e folha respectivamente (Figura 10). Para as mesmas partes das plantas e concentração, houve redução na biomassa seca em 14, 10 e 20% quando utilizado a maior concentração (Figura 11).

Figura 10 - Comprimento da raiz e parte aérea (cm) de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a diferentes concentrações (%) de extrato aquoso da raiz, caule e folha da mucuna-preta.



*Barras correspondem ao erro padrão (n=4). Médias seguidas por mesma letra maiúscula para as diferentes partes da planta (raiz, caule e folha) e minúscula para as concentrações (0, 25, 50, 75 e 100%) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade.

Figura 11 - Biomassa seca total (mg) de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a diferentes concentrações (%) de extrato aquoso da raiz, caule e folha da mucuna-preta.

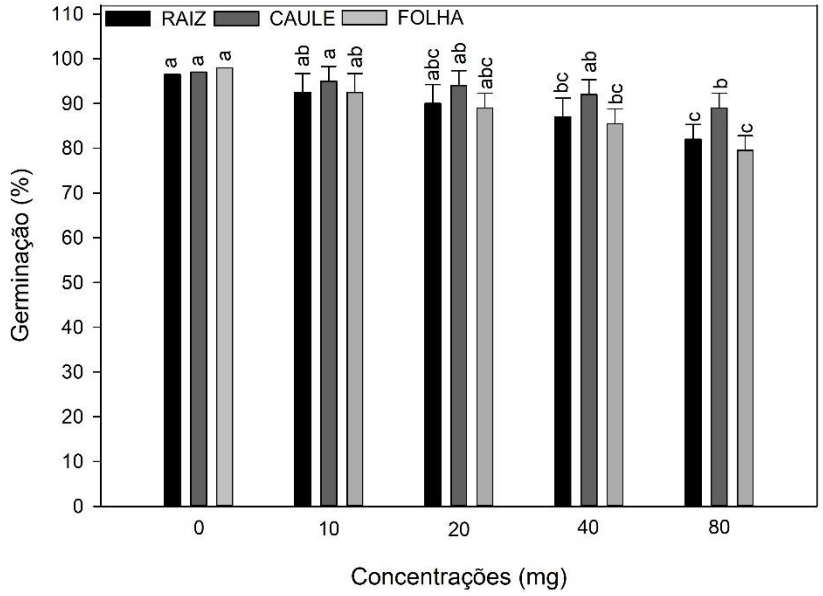


*Barras correspondem ao erro padrão (n=4). Médias seguidas por mesma letra maiúscula para as diferentes partes da planta (raiz, caule e folha) e minúscula para as concentrações (0, 25, 50, 75 e 100%) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade.

4.1.2 Resultados - Método sanduíche

Na germinação o efeito verificado foi apenas na concentração (Figura 12), diferente do que ocorreu no estudo 1 com extrato aquoso, sendo essa, influenciada negativamente com o aumento da quantidade da planta adicionada. A redução de germinação chegou a 27, 23 e 20% com 80 mg de folha, raiz e caule, respectivamente (Figura 12). As partes das plantas de mucuna-preta que mais afetaram a germinação de alface foram folha>raiz>caule.

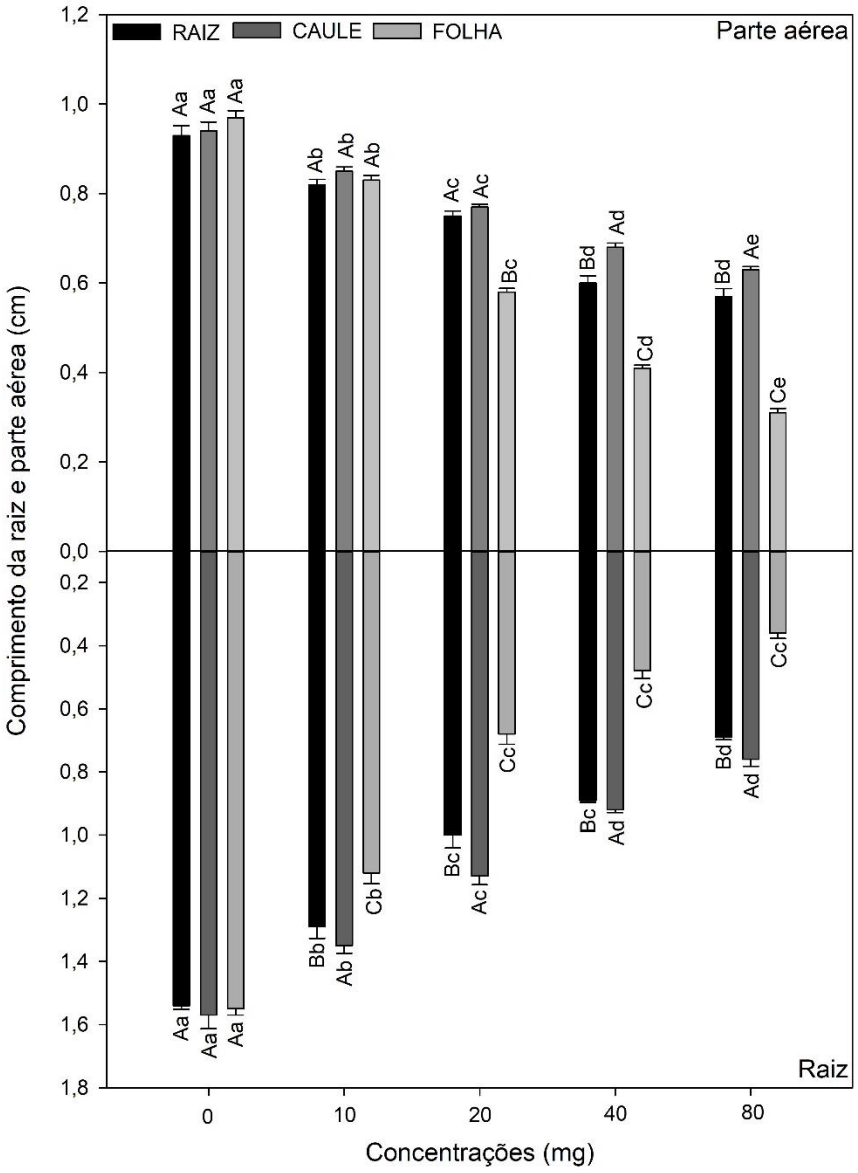
Figura 12 - Germinação (%) de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a diferentes concentrações (mg) de raiz, caule e folha da mucuna-preta pelo método sanduíche.



*Barras correspondem ao erro padrão. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para as diferentes partes da planta (raiz, caule e folha) e minúscula para as concentrações (0, 10, 20, 40 e 80 mg) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade.

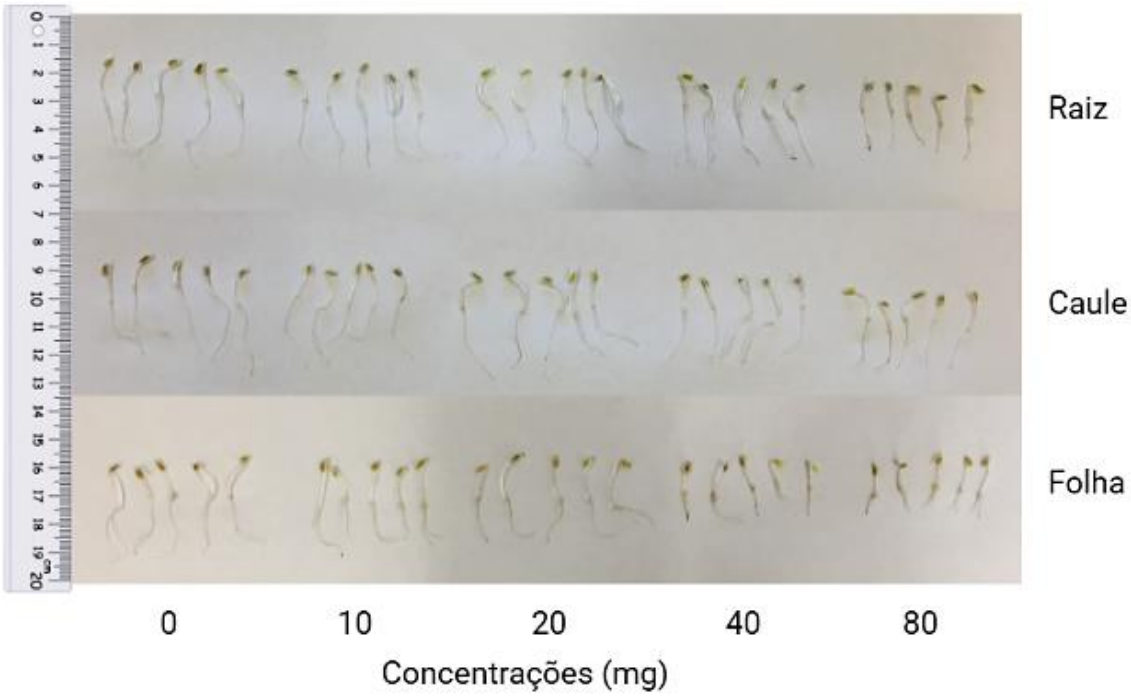
O efeito sobre o desenvolvimento da raiz e parte aérea da alface variou em função da parte da planta e concentração utilizada (Figura 13 e 14). A intensidade de inibição foi diretamente relacionada à quantidade adicionada, sendo os efeitos mais intensos observados na presença de 80 mg. Nessa concentração, as maiores reduções para a parte aérea foram de 68, 38 e 32% para a folha, raiz e caule, respectivamente, enquanto para a raiz foi de 76, 55 e 51% seguindo a mesma ordem da planta citada anteriormente. Esses resultados também estão de acordo com os encontrados no experimento 1. Vale destacar o efeito da coloração preta nas pontas das raízes das plântulas de alface (Figura 14) que podiam ser facilmente destacadas apresentando alta fragilidade.

Figura 13 - Comprimento da raiz e parte aérea (cm) de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a diferentes concentrações (mg) da raiz, caule e folha da mucuna-preta.



*Barras correspondem ao erro padrão. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para as diferentes partes da planta (raiz, caule e folha) e minúscula para as concentrações (0, 10, 20, 40 e 80 mg) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade.

Figura 14 - Efeitos das diferentes concentrações (mg) da raiz, caule e folha da mucuna-preta em plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.).



Fonte: Roque de Carvalho Dias

Figura 15 - Sintomas de coloração preta na extremidade radicular das plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a diferentes concentrações (mg) da raiz, caule e folha da mucuna-preta.

Fonte: Roque de Carvalho Dias

4.1.3 Discussão

As características físico-químicas dos extratos aquosos da raiz, caule e folha da mucuna-preta (Tabela 2) são utilizadas como parâmetros para averiguar se os efeitos sobre a germinação e vigor das sementes estão relacionados aos possíveis compostos alelopáticos ou a presença de outras substâncias como açúcares,

aminoácidos, sais entre outros, que podem influenciar na concentração iônica e ser osmoticamente ativos (FERREIRA; BORGUETTI, 2004).

Em relação ás características físico-químicas encontradas nos extratos estudados, isto é, valores de pH (5,35 - 7,12) e condutância elétrica (CE) (2,18 - 14,51 μS cm^{-1}), tais parâmetros não são capazes de interferir negativamente na germinação da alface conforme já relatado por vários autores, como Oliveira *et al*. (2013), Rizzi *et al*. (2016) e Matias *et al*. (2021). Da mesma forma, Costa *et al*. (2020) verificaram que valores de CE abaixo de 20 μS cm^{-1} não atrapalham a germinação da alface. Além disso, valores de pH inferiores a 3,0 e superiores a 9,0 podem influenciar negativamente na germinação e crescimento das raízes (RICE, 1984). Assim, os valores de pH observados para os extratos de mucuna-preta no presente estudo não interferiram nos resultados encontrados.

Durante o processo germinativo das sementes, algumas substâncias alelopáticas capazes de inibir ou retardar o crescimento e/ou multiplicação das células podem ser absorvidas em conjunto com a água, afetando assim a germinação das mesmas (GONZALEZ et al., 2002), corroborando no presente trabalho, em que a germinação foi afetada com as concentrações dos extratos aquosos (Experimento 1) e lixiviados pelo método sanduíche (Experimento 2) das partes da planta. Há diversos trabalhos com diferentes metodologias de confecção de extratos e órgãos usados da mucuna-preta avaliando o efeito alelopático na germinação e IVG de plantas receptoras, como a alface. O uso dessa planta como bioindicadora é devido ao seu uso universal, facilidade e alta sensibilidade a possíveis substâncias alelopáticas (APPIAH; AMOATEY; FUJII, 2015). Hachinohe; Sunohara e Matsumoto (2004) concluíram que a alface é a planta mais sensível aos ensaios submetidos com mucuna-preta.

Por exemplo, em extratos aquosos das folhas e raízes da mucuna-preta, houve redução na germinação e IVG da alface (TEIXERA; ARAÚJO; CARVALHO, 2004; SOUZA; YAMASHITA, 2006; ERASMO et al., 2011). Já em extrato hidroalcoólico com a mesma espécie citada anteriormente, a germinação e o IVG em alface e cenoura foram comprometidas, sendo que a menor concentração (25% v/v) utilizada diminuiu em mais de 90% a germinação das plantas estudadas (SOUZA *et al*., 1999). Rankrape *et al*. (2018) verificaram que os extratos aquosos das folhas secas da *Mucuna cinereum* reduziram a germinação de plantas de aveia, centeio e trigo. Enquanto para *M*. *pruriens*, os extratos aquosos das folhas frescas (ZASADA *et al*., 2006) e secas

(FUJII, 2003) inibiram a germinação da alface. Ao avaliar a alelopatia das folhas de oito espécies de mucuna-preta, Appiah, Amoatey e Fujii (2015) verificaram efeito negativo na germinação da alface para o método sanduíche e não para o extrato aquoso. Dessa forma, sobre os efeitos alelopáticos na germinação, ressalta-se que em campo, isso pode significar prejuízo a cultura de interesse devido ao baixo poder de competição e consequente redução de produtividade ocasionado pela interferência da mucuna-preta.

O T50 representa o tempo médio para ocorrência de 50% de germinação, sendo observado que na presença dos extratos foi necessário mais dias para que a metade das sementes germinassem. Portanto, a planta de mucuna-preta tem o potencial de retardar o crescimento de plantas de alface. Corroborando com os encontrados nesse trabalho, Kaiira *et al*. (2021), utilizando os lixiviados da mucuna-preta, verificaram atraso para a germinação em arroz e milho. Variáveis relacionadas a germinação e vigor são comumente utilizadas em experimentos alelopáticos e representam importante estratégia inicial para verificar os efeitos desses compostos (REIGOSA *et al*., 2013). Além disso, o atraso ou irregularidade na germinação é prejudicial, pois a semente fica muito tempo exposta no campo e, assim, fica vulnerável ao ataque de pragas e doenças, condições climáticas desfavoráveis e interferência na fase pré-germinativa (ALENCAR *et al*., 2016).

Para o comprimento da parte aérea e raiz e biomassa seca das plântulas de alface (método extrato aquoso e sanduíche) verificou-se também efeitos alelopáticos negativos nessas variáveis. Em ambas as metodologias usadas, o crescimento da planta é influenciado, em grande parte, pela germinação. Por isto, alterações no vigor podem originar plântulas com crescimento reduzido (CENTENARO *et al*., 2009), corroborando com os resultados encontrados nesse trabalho. Nos estudos alelopáticos, mudanças na germinação e vigor podem resultar de diversos efeitos causados em nível primário. Dentre eles, alterações na permeabilidade de membranas, na transcrição e tradução do DNA, no funcionamento de mensageiros secundários, na respiração, devido ao sequestro de oxigênio, na conformação de enzimas e receptores, ou ainda pela combinação destes fatores (FERREIRA; AQUILA, 2000).

A coloração preta nas extremidades radiculares das plantas de alface foi verificada de forma semelhante ao estudo do efeito da concentração de L-Dopa em raízes de alface (NISHIHARA *et al*., 2004) e pepino (MUSHTAQ, SUNOHARA,

MATSUMOTO, 2013). Segundo o último estudo, aos autores consideraram que esse efeito indica a formação de melanina e que de acordo com o estudo foi maior com o aumento da concentração de L-DOPA.

Os efeitos alelopáticos da mucuna-preta estão associados também a diminuição da germinação das sementes (BIDO *et al*., 2018) e como consequência a influência negativa no crescimento inicial e desenvolvimento da planta. Nesse contexto, vale destacar que a atividade alelopática da mucuna-preta pode representar uma ferramenta de manejo integrado de plantas daninhas. Efeitos alelopáticos da mucuna-preta (*Mucuna* spp.) foram verificados em *Cyperus rotundus* L. (ALMEIDA; CÂMARA, 2012), *Digitaria insularis* L. (PETTER *et al*., 2015), *Eleusine indica* (L.) gaertn (RUGARE, PIETERSE, MABASA, 2020), *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donell) (MONQUERO *et al*., 2009), *Lolium rigidum* L. (TRAVLOS *et al*., 2018) e *Spermacoce verticillata* L. (VARGAS, PASSOS, KARAM, 2018).

Nos bioensaios realizados nesse trabalho destacamos que a mucuna-preta apresentou alelopatia nos testes realizados para alface. Além disso, os efeitos foram mais acentuados na sequência de folha > raiz > caule. Vale destacar que todos os órgãos da planta têm potencial para armazenar aleloquímicos, mas a quantidade e o caminho pelos quais são liberados diferem de espécie para espécie (TAIZ *et al*., 2017). Em linhas gerais, a folha é o órgão da planta mais ativo metabolicamente, assim, é de se esperar que elas apresentem maior diversidade de aleloquímicos (RIBEIRO *et al*., 2009). Segundo Soares *et al*. (2014) e Rugare, Pieterse e Mabasa (2020), as folhas de *Mucuna pruriens* são os órgãos da planta com maior quantidade de aleloquímicos e por isso, possui maior efeito alelopático, corroborando com os resultados encontrados.

A atividade alelopática de mucuna-preta é atribuída à presença de aleloquímicos encontrados nessa planta, sendo o principal composto relacionado a fitotoxicidade o L-3,4- dihidroxifenilalanina (L-DOPA), um aminoácido não-proteico precursor de alcalóides e fenilpropanóides (FUJII; SHIBUYA; YASUDA, 1991; FUJII; SHIBUYA; YASUDA, 1992, SOARES *et al*., 2014) e corresponde a 0,5-1,5% do peso das folhas frescas e 6-9% da semente seca (FUJII, 1999). A formação desse composto é resultado da hidroxilação da tirosina pela enzima tirosina hidroxilase na rota do ácido chiquímico (MARCHIOSI *et al*., 2020).

A fitointoxicação pelo L-Dopa é relacionada, em grande parte, a metabolização desse composto (HACHINOHE; SUNOHARA; MATSUMOTO, 2004). Segundo esses

autores, a maior porcentagem de 14C-L-Dopa encontrada em capim-arroz (*Echinochloa crus-galli* L.) diferentemente do encontrado em alface (*Lactuca sativa* L. cv. Great lakes 366), espécies de maior e menor tolerância, respectivamente, explica que a causa da fitointoxicação da planta mais sensível se deu devido a maior metabolização do L-DOPA. A oxidação desse composto pela polifenoloxidase (PPO), a partir da via da síntese da melanina, gera aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo responsável pelo efeito inibitório em plantas suscetíveis (HACHINOHE *et al*., 2004; HACHINOHE; MATSUMOTO, 2005; HACHINOHE; MATSUMOTO, 2007; MARCHIOSI *et al*., 2020), efeito esse que também pode ser verificado nesse estudo (Figura 15). Assim, as consequências dessa reação podem causar danos severos às proteínas celulares e levar à inibição de várias enzimas importantes durante a fotossíntese, peroxidação de lipídios e pigmentos, disfunção mitocondrial, fragmentação do DNA e apoptose (PATTISON; DEAN; DAVIS, 2002).

Por outro lado, há evidências que a produção de EROs não é o único fator responsável pela fitointoxicação de L-DOPA. Plantas de soja expostas ao L-DOPA apresentaram alta atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL) e alto teor de lignina (SOARES *et al*., 2007, 2012). Segundo esses autores, a possível metabolização do L-DOPA em fenilalanina pode ter estimulado a via dos fenilpropanóides e a lignificação, com consequente inibição do crescimento das plântulas através de enrijecimento da parede celular, processo relacionado à formação de ligações cruzadas entre os polímeros da parede celular. No mesmo sentido, Siqueira-Soares *et al*. (2013) concluíram que a inibição do crescimento em plantas de milho pela aplicação do L-DOPA foi associada ao aumento da lignificação. No entanto, Bido *et al*. (2018) constataram que após a aplicação de L-DOPA em plantas de soja houve redução na atividade de enzimas como a PAL e álcool cinamílico-desidrogenase (CAD) e lignina. Esses autores, consideraram que o tempo de exposição maior do L-DOPA seguido da renovação da solução nutritiva e consequente absorção proeminente do composto pode ser o motivo pela diferença dos resultados encontrados.

O perfil de expressão gênica em plantas *Arabidopsis thaliana* expostas ao L-DOPA revelou aumento na expressão de 110 genes, muitos dos quais associados à homeostase de metais, como Zn, Cu e Fe; por outro lado, regulou negativamente 69 genes, que são divididos em diferentes categorias funcionais, principalmente com base na localização subcelular, metabolismo e proteínas com função de ligação ou

exigência de cofator (GOLISZ *et al*., 2011). Esses autores concluíram, que o L-DOPA atua por dois principais mecanismos: metabolismo de aminoácidos e desregulação da homeostase de metais. A presença do L-DOPA em *Mucuna pruriens* ocorre em todos os órgãos da planta, com destaque para as folhas (FUJII *et al*., 1991; PRAKASH; NIRANJAN; TEWARI, 2001; SIDDHURAJU; BECKER, 2001); portanto, esses resultados, confirmam o potencial alelopático para a mucuna-preta (*Mucuna pruriens* var. *utilis*) e seu efeito acentuado quando associado as folhas dessa planta, possivelmente devido a presença do L-DOPA.

Dessa forma, vale ressaltar a importância dos estudos de alelopatia com diferentes metodologias e plantas receptoras. Paralelamente, estudos em condições naturais são fundamentais para o entendimento da complexidade das interações relacionadas aos efeitos alelopáticos da mucuna-preta. A realização de trabalhos abrangentes, com variações de metodologias, condições laboratoriais e de campo são de suma importância, a fim de minimizar os erros na interpretação de resultados, além de contribuir com o desenvolvimento dos estudos relacionados a alelopatia.

4.2 ESTUDO 2 - ALELOPATIA DA MUCUNA-PRETA EM MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

4.2.1 Resultados

Na Tabela 5, estão descritos os atributos químicos do solo após a retirada das plantas de mucuna-preta (30 DAE) e das mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar (MPB) (63 DAT). Destaca-se que não houve valores discrepantes nos resultados encontrados, desconsiderando-se assim possíveis interferências de caráter nutricional nos resultados obtidos.

Tabela 6 - Atributos químicos do solo após cultivo de mucuna-preta (30 DAE) e das mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar (MPB) (63 DAT).

Períodos	Tratamentos (plantas por vaso)	P	K^+	Ca^{2+} + Mg^{2+}	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
30 DAE[1]	0	113[3]	5,33	45	53	0,47	0,5	69	1,4	3,1
	2	103	5,53	41	52	0,38	0,6	67	1,2	4,2
	4	108	5,27	41	53	0,31	0,6	71	1,2	3,2
	8	120	5,09	41	50	0,46	0,6	60	1,4	3,8
63 DAT[2]	0	74	2,45	33	37	0,36	0,7	44	0,6	2,2
	2	76	3,00	33	30	0,75	0,7	48	0,4	3,5
	4	80	2,63	33	46	0,25	0,8	47	0,6	3,0
	8	77	2,73	38	47	0,36	0,6	50	0,4	4,9

[1] Dias após a emergência. [2] Dias após o transplantio. [3]Análise composta da duplicata.

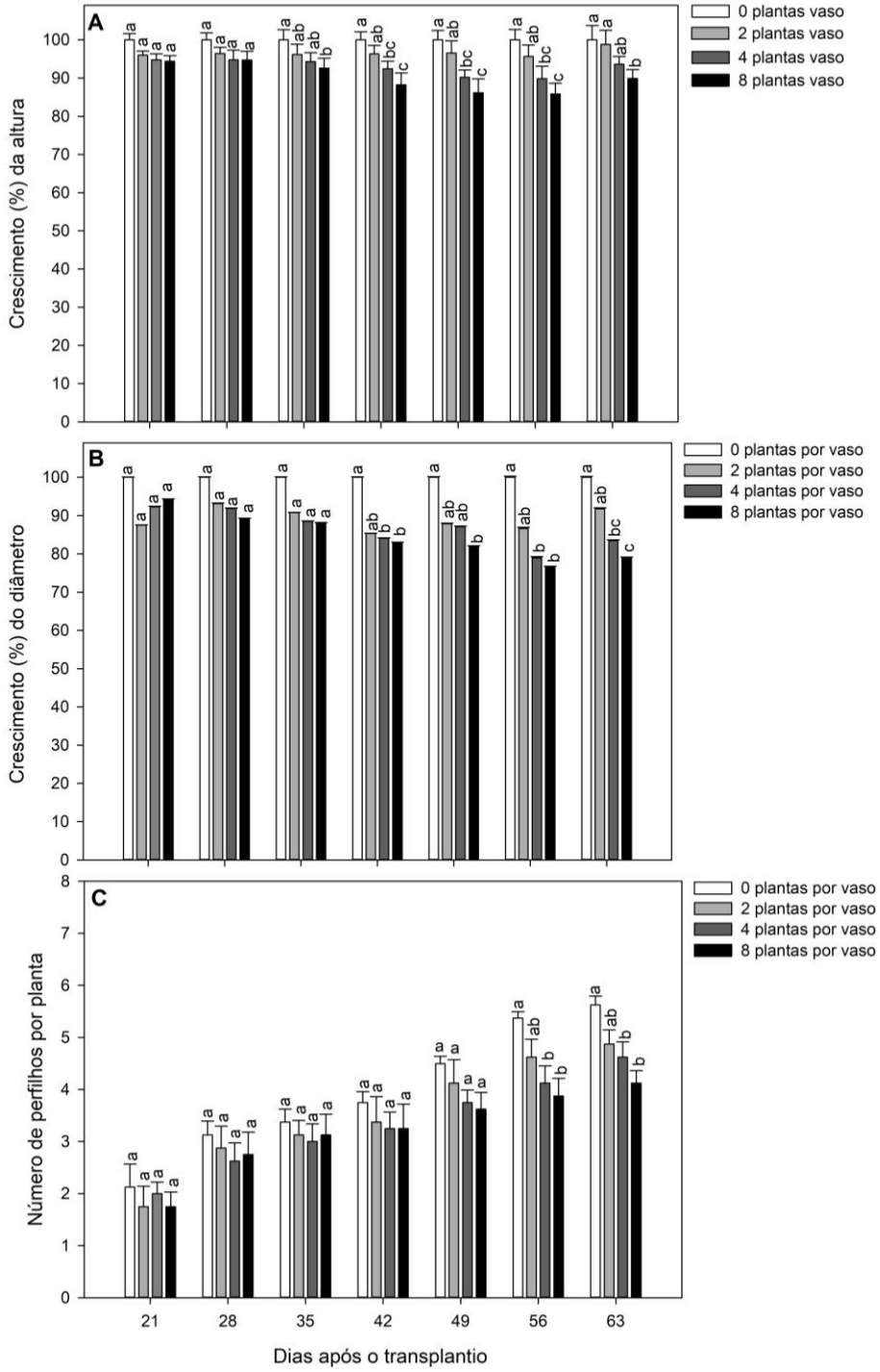
Para as variáveis altura, diâmetro, perfilhamento e biomassa seca da parte aérea e raiz das MPB de cana-de-açúcar os experimentos apresentaram semelhança de resultados e não apresentaram diferença significativa pela análise conjunta (Apêndice A), assim os dados foram apresentados com a média dos dois experimentos.

As mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar tiveram seu crescimento inicial afetado negativamente após o cultivo da mucuna-preta (Figura 16, 17 e 18). Os efeitos nos parâmetros analisados foram variados de acordo com o período analisado. Nota-se ainda que a redução no diâmetro, altura e número de perfilhos foi mais acentuado quando foi cultivado oito plantas de mucuna-preta.

Tanto crescimento em altura quanto diâmetro, tiveram seus valores reduzidos a partir de 42 DAT (Figura 16A e B) nas mudas que foram previamente cultivadas em vasos com quatro e oito plantas de mucuna-preta. As reduções de crescimento da altura nesses tratamentos (4 e 8 plantas de mucuna-preta) foram de 8 e 12%, 10 e 14%, 10 e 14% e 6 e 10% (Figura 16A) e para crescimento do diâmetro, 16 e 17%, 13 e 18%, 21 e 24% e 17 e 21%, respectivamente para 42, 49, 56 e 63 DAT (Figura 16B). Para os perfilhos, as reduções ocorreram a partir de 56 DAT nos tratamentos que o solo foi previamente cultivado com duas maiores densidades de mucuna-preta (4 e 8 plantas), alcançando aos 63 DAT reduções de 23 e 25% e 18 e 26%, respectivamente.

Nesse contexto, entende-se que redução no crescimento da planta possivelmente pela alelopatia ocorreu até um determinado período, seguido da recuperação das plantas, indicando que o efeito alelopático não é permanente e crescente.

Figura 16 - Crescimento (%) da altura, diâmetro e número de perfilhos de muda pré-brotada de cana-de-açúcar em transplantio após o cultivo de mucuna-preta.

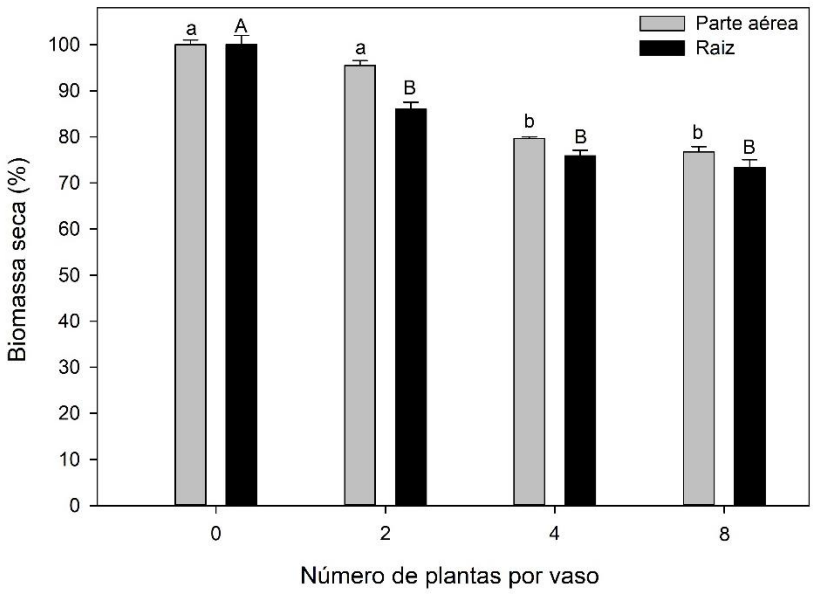


Médias seguidas por mesma letra, dentro de cada época, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 4). Os valores representam a média de dois experimentos.

A biomassa seca da parte aérea e raiz das MPB foi reduzida com o aumento da densidade das plantas de mucuna-preta cultivadas (Figura 17). Vale destacar que

as maiores reduções foram com 4 e 8 plantas de mucuna-preta, ou seja, 24 e 26% de redução nas raízes e 20 e 23% de redução na parte aérea, respectivamente. Além disso, o tratamento com duas plantas reduziu a biomassa das raízes, demonstrando assim, maior sensibilidade para esse órgão.

Figura 17 - Biomassa seca (%) da parte aérea e raiz de muda pré-brotada de cana-de-açúcar em transplantio após o cultivo de mucuna-preta.



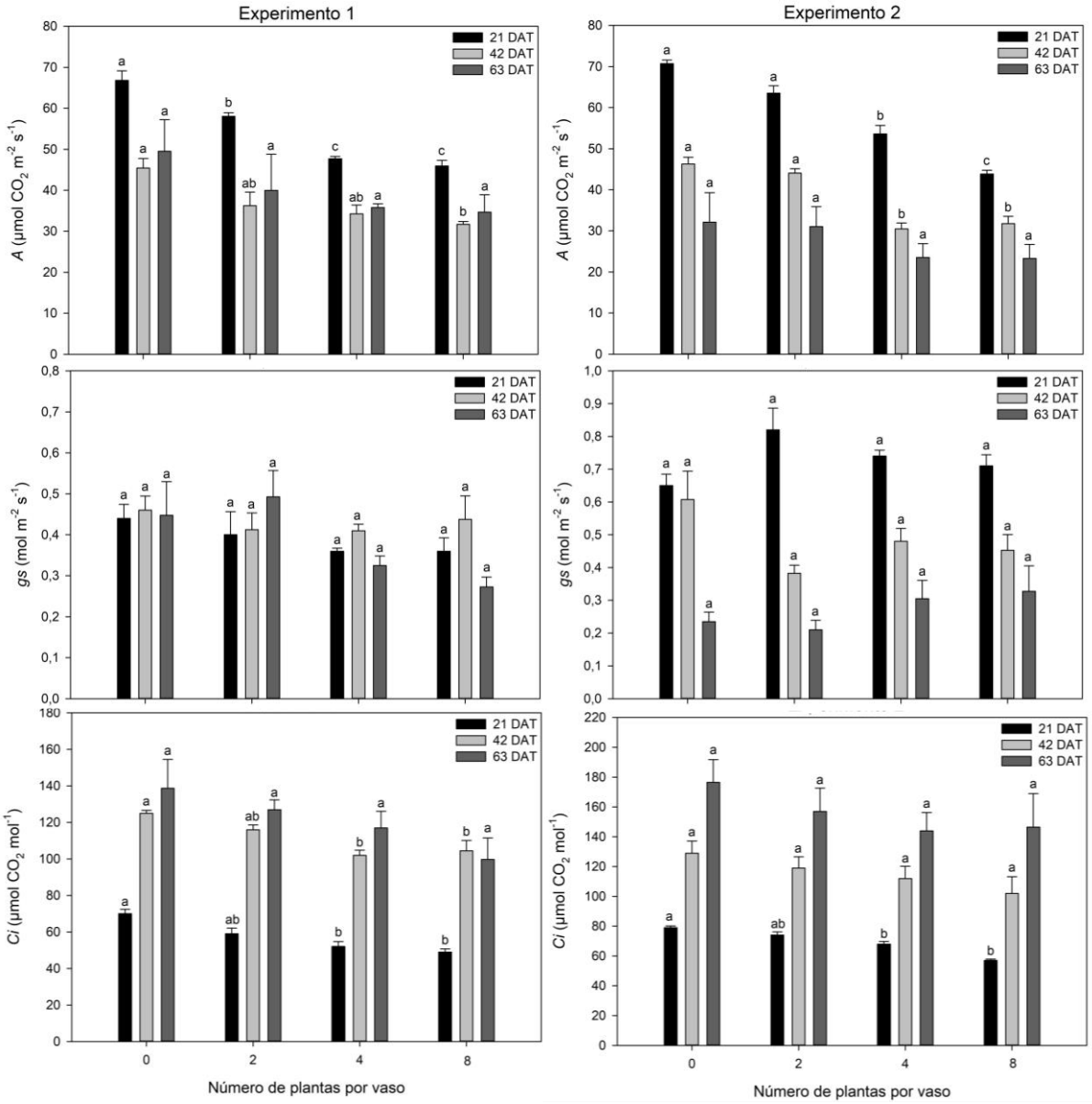
Médias seguidas por mesma letra minúscula para parte aérea e maiúscula para raiz entre densidade populacional, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 4). Os valores representam a média de dois experimentos.

Figura 18 - Efeito em muda pré-brotada de cana-de-açúcar transplantadas em solo cultivado com diferentes densidades de mucuna-preta (0, 2, 4 e 8 plantas por vaso) aos 63 DAT.

Fonte: Roque de Carvalho Dias

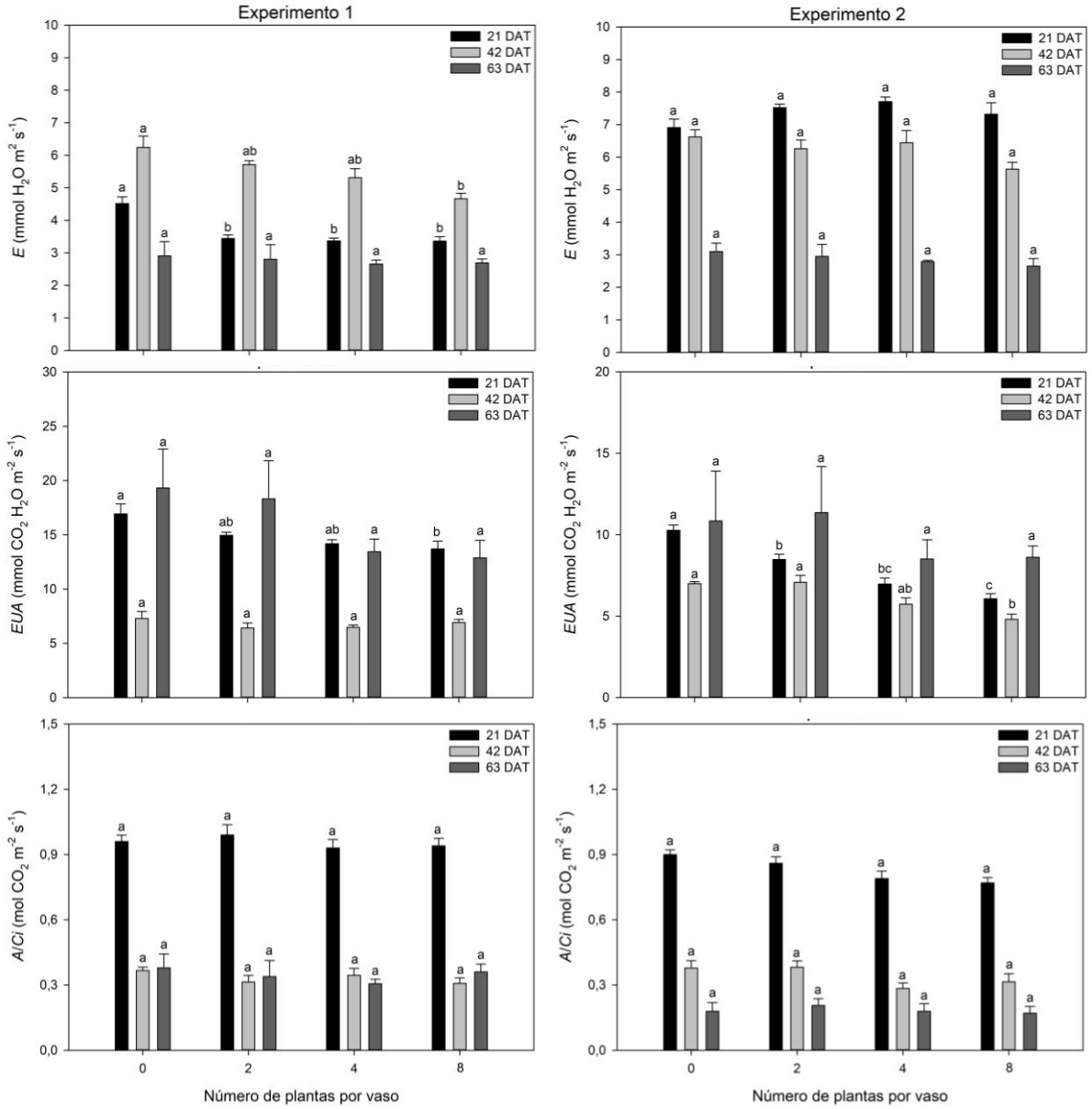
Os dados de trocas gasosas serão discutidos e apresentados para cada experimento, pois não foi possível agrupar os experimentos por meio da análise conjunta (Apêndice A). Para as trocas gasosas observou-se os efeitos mais intensos no período inicial avaliado, ou seja, nas mudas pré-brotada (MPB) de cana-de-açúcar após 21 dias de transplantio após o cultivo de mucuna-preta (Figura 19 e 20). Nesse período e em ambos os experimentos, a concentração interna de carbono (*Ci*), assimilação liquida de CO_2 (*A*) e o uso eficiente da água (*EUA*) tiveram reduções nos valores conforme o aumento da densidade de mucuna-preta que esteve presente antes ao transplantio da MPB. Já aos 42 DAT notou-se diferenças nas variáveis *Ci* e *E* no experimento 1, *EUA* no experimento 2 e na *A* em ambos os experimentos. Enquanto a *gs* e *A*/*Ci* não tiveram seus valores influenciados. Na última avaliação, não foi observado efeito dos tratamentos na resposta para as trocas gasosas, independente do experimento e tratamento analisado.

Figura 19 - Taxa de assimilação líquida de CO_2 (*A*), condutância estomática (*gs*) e concentração interna de CO_2 (*Ci*) em muda pré-brotada de cana-de-açúcar aos 21, 42 e 63 dias após ao transplantio (DAT) de mucuna-preta.



Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 4).

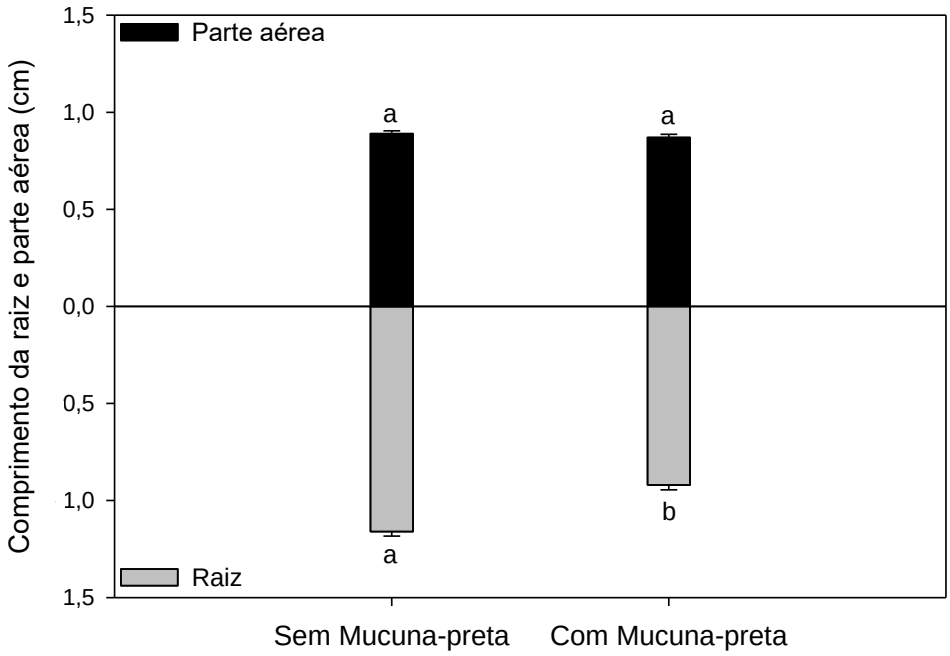
Figura 20 - Taxa de transpiração (*E*), uso eficiente da água (*EUA*) e eficiência instantânea de carboxilação (*A*/*Ci*) em muda pré-brotada de cana-de-açúcar aos 21, 42 e 63 dias após ao transplantio (DAT) de mucuna-preta.



Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 4).

Para o bioensaio utilizando o solo da rizosfera da mucuna-preta, notou-se que as raízes das plântulas de alface tiveram seu comprimento comprometido (Figura 21). Como no ESTUDO 1, houve o efeito da coloração escurecida nas pontas das raízes (Figura 22).

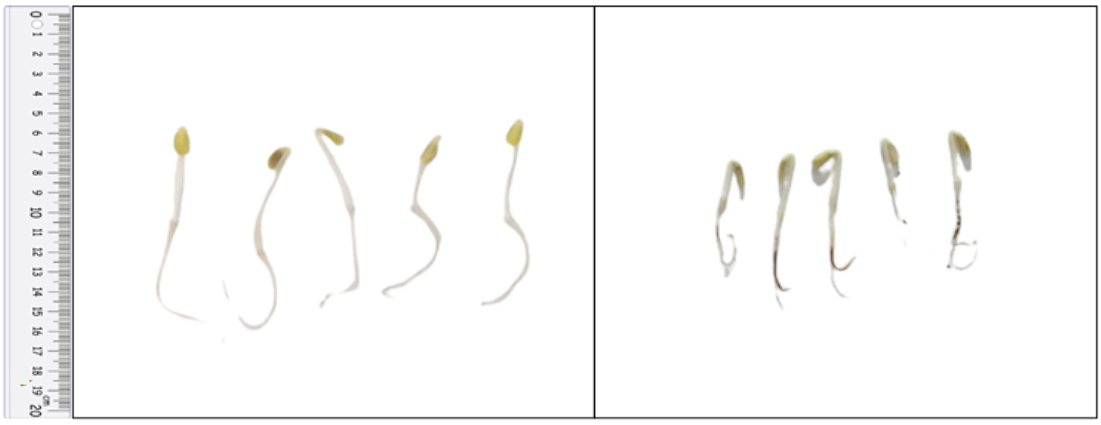
Figura 21 - Comprimento da raiz e parte aérea (cm) de plântulas de alface utilizadas no método de análise do solo da rizosfera da mucuna-preta.



Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de t de Student ao nível de significância de 5% de probabilidade. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 6).

Figura 22 - Plântulas de alface utilizadas no método de análise do solo da rizosfera da mucuna-preta.

Solo sem mucuna-preta Solo com mucuna-preta



Fonte: Roque de Carvalho Dias

4.2.2 Discussão

A mucuna-preta produz muitos compostos secundários alelopáticos, sendo considerado o principal o L-Dopa (L-3,4- dihidroxifenilalanina), um aminoácido não-proteico (SOARES *et al*., 2014). Esse composto é liberado no solo a partir das raízes

(FURUBAYASHI; HIRADATE; FUJII, 2005) e sua concentração pode chegar a 50 mg L^{-1} nas proximidades das raízes (PUGALENTHI; VADIVEL; SIDDHURAJU, 2005). Segundo Fujii (1999) e Golisz *et al*. (2011), a produção de massa fresca pode variar entre 20 - 30 t ha^{-1}, com adição entre 100 - 450 kg ha^{-1} de L-Dopa ao solo. Diversos trabalhos relatam os efeitos alelopáticos do L-dopa de mucuna-preta em culturas e plantas daninhas (MARCHIOSI *et al*., 2020).

A alelopatia é uma forma de interferência direta que pode ser observada entre as plantas. Contudo, na prática, é bastante difícil distinguir os efeitos decorrentes da alelopatia e/ou da competição. Pitelli (1985) esclarece que a competição ocorre quando há redução ou remoção de um fator de crescimento, enquanto a alelopatia ocorre devido a adição de um fator no meio. Portanto, a maioria dos trabalhos limitaram a avaliação genérica da interferência de mucuna-preta e/ou espécies de hábito de crescimento semelhante na cultura da cana-de-açúcar.

Nesse contexto, Bressanin *et al*. (2016) encontraram que a interferência da mucuna-preta reduziu em 50% a produtividade da cana-de-açúcar, além de afetar a qualidade do produto colhido como a redução do Brix e açúcar total recuperável (ATR). Nesse mesmo trabalho, os autores consideraram que quando a mucuna-preta conviveu com a cultura desde o início do ciclo até a colheita, o acúmulo foi de 4,37 g m^{-2} proporcionando redução de 1 t ha^{-1} de colmos da cultura. Plantas daninhas de hábito trepador do gênero *Ipomoea* e *Merremia*, semelhante como a mucuna-preta, podem proporcionar redução de até 24% na produtividade da cana-de-açúcar (AZANIA *et al*., 2009). Silva *et al*. (2009) observaram que a interferência de *Ipomoea hederifolia* L. reduziu a produtividade da cana-de-açúcar em até 46%, demonstrando assim, a importância no controle dessas plantas em canaviais.

Neste estudo, foi observado que quanto maior a densidade populacional de mucuna-preta cultivada maiores foram as reduções dos parâmetros avaliados (crescimento da altura, crescimento do diâmetro, número de perfilhos e biomassa seca da raiz e parte aérea) (Figura 16 e 17). Também já foi relatado que a incorporação de diferentes partes da mucuna-preta, com destaque para as raízes, reduziu o crescimento das plantas de caniço-branco (*Imperata cylindrica* (L.) Raeusch.) (BERNARD; UDENSI, 2015). Além disso, segundo esses autores, a redução de altura das plantas, quando houve a incorporação da mucuna-preta, foi superior a 20%. No mesmo estudo, o uso de diferentes densidades de semeadura da mucuna-preta em conjunto com caniço-branco, promoveu a diminuição na altura e o

número de perfilhos da planta, corroborando com os achados nesse trabalho. Segundo esses autores, os efeitos observados devem-se a presença de aleloquímicos pela liberação de exsudados radiculares e o tempo de permanência desses compostos é variável conforme o tempo.

Os resultados obtidos pelo método de análise do solo da rizosfera da mucuna-preta (Figura 21 e 22) estão de acordo com os encontrados por Fujii, Furubayashi, Hiradate (2005), que verificaram reduções no comprimento radicular de plântulas de alface. Segundo esses autores, *Vicia villosa* Roth, *Solidago altissima* L. e *Medicago sativa* L. mostraram forte atividade inibitória e os efeitos foram observados principalmente nas raízes em comparação a parte aérea. Esses resultados demonstram o potencial efeito alelopático presente no solo da rizosfera da mucuna-preta.

Respostas similares também já foram observadas para outras culturas em que lixiviados das raízes da mucuna-preta afetaram negativamente a germinação de plantas de milho e arroz (KAIIRA *et al*., 2021a). Os resíduos vegetais da mucuna-preta apresentam alelopatia podendo reduzir a altura, número de perfilhos e folhas, biomassa de outras plantas (TRAVLOS *et al*., 2018; KAIIRA *et al*., 2021c), o que atesta o efeito alelopático das raízes da mucuna-preta sob outras plantas. Além disso, a mucuna-preta também interfere no controle da composição florística de plantas daninhas, indicando o potencial alelopático dessa planta em campo (FAVERO *et al*., 2001; MASCARENHAS *et al*., 2012), o que pode refletir, por outro lado, em cuidados para a implementação de culturas subsequentes a mucuna-preta, como a cana-de-açúcar.

Experimentos realizados por Kaiira *et al*. (2021b), em casa-de-vegetação e campo demonstraram efeito alelopático negativo da mucuna-preta para a cultura do arroz, quando semeada em conjunto. Em ambas as condições houve reduções no comprimento radicular, número de perfilhos e panículas e produtividade do arroz. Além disso, esses autores verificaram a diminuição da presença de erva-de-brucha (*Striga asiatica* (L.) Kuntze) em condições de campo, e associaram essa redução a possível liberação de compostos como o L-DOPA pelas raízes da mucuna-preta.

Os aleloquímicos podem afetar o crescimento e desenvolvimento das plantas em decorrência a diversas funções vitais. Por exemplo, Marchiosi *et al*. (2016) verificaram que plantas de soja tratadas com L-DOPA e com extratos da semente de mucuna-preta apresentaram danos no meristema radicular e diminuição na absorção

de nutrientes. Para esses autores, a combinação desses fatores levou a menores taxas de comprimento, peso de raiz e caule e área foliar, sugerindo-se a atuação do L-Dopa. Essas moléculas influenciam também nos processos fisiológicos das culturas, como aumento da permeabilidade da membrana celular, proliferação celular e síntese de DNA em meristemas de plantas, afetando assim as taxas de crescimento das culturas (EINHELLIG, 1995; INDERJIT; DUKE, 2003). Além disso, os aleloquímicos podem restringir a absorção de nutrientes e as atividades do sistema regulador do crescimento, que posteriormente afetam o crescimento normal das plantas e podem causar a morte do tecido vegetal (CHENG; CHENG, 2015). Essas informações estão de acordo com Kaiira *et al*. (2021b) que constataram redução em 15% no teor de fósforo nas folhas de milho em plantio intercalado com mucuna-preta.

Paralelamente, a fitointoxicação do L-Dopa tem sido associada também a produção de radicais livres decorrente da sua oxidação. Durante esse processo ocorre a atuação da polifenoloxidase (PPO) que ocasiona um aumento na produção de EROs (MARCHIOSI *et al*., 2020). Como consequência, esse processo pode causar danos severos às proteínas da célula, além de afetar processos enzimáticos importantes durante a fotossíntese, peroxidação de lipídios e pigmentos, disfunção mitocondrial e fragmentação do DNA e apoptose (PATTISON *et al*. 2002), sendo uma das causas do efeito de inibição desse composto em plantas.

Em complemento, alguns estudos consideram também questões enzimáticas relacionadas ao crescimento das plantas como outro fator de inibição pelo L-Dopa. BIDO *et al*. (2018) verificaram efeitos alelopáticos na redução na atividade de enzimas como fenilalanina amônialiase (PAL), álcool cinamílico-desidrogenase (CAD) e lignina em plantas de soja. Para esses autores, esses resultados suportam a hipótese de que o L-Dopa afeta o processo de suporte estrutural das plantas provocando o menor crescimento das plantas. Para obter mais informações sobre o modo de ação da L-DOPA em plantas, Golisz *et al*. (2011) analisaram o perfil de expressão gênica em *Arabidopsis thaliana* expostas ao aleloquímicos e verificaram que os genes regulados estão relacionados a regulação do metabolismo e homeostase de metais.

Em vista disso, as mudas de cana-de açúcar (MPB) apresentaram reduções significativas nas trocas gasosas com o aumento da densidade de cultivo de mucuna-preta, em ambos os experimentos (Figura 19 e 20). Sabe-se, portanto, dos efeitos em cascata que os aleloquímicos podem proporcionar nesses parâmetros, como citado anteriormente. Marchiosi et *al*. (2016) verificaram que plantas de soja submetidas a

aplicação de L-DOPA, apresentaram menores valores relacionados as trocas gasosas em *A*, *gs* e *E*. Ademais, alterações em parâmetros morfológicos da folha como aumento na deposição de cera próximo aos estômatos também foram observados, sugerindo-se que a baixa concentração de *Ci* e consequências na *A* e *E* interferiram diretamente no crescimento da planta. Valores baixos na *Ci* podem provocar o influxo deste componente nas células do mesófilo, assim, a planta utiliza o CO_2 proveniente da respiração para manter um nível mínimo de taxa fotossintética, tornando-a limitada (TAIZ *et al*., 2017), corroborando com os resultados encontrados (Figura 19). Os aleloquímicos também podem provocar determinada limitação estomática que é acompanhada pela concentração interna de carbono representando efeitos negativos assimilação de CO_2 (ZHOU; YU, 2006).

Nesse contexto, o processo fotossintético é influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos, sendo essenciais por exemplo, o CO_2 e a água. Assim, uma menor taxa de assimilação de CO_2 com aumento da transpiração de água, significa menor acúmulo de hexoses com maior quantidade de água na planta afetando diretamente as variáveis relacionadas ao crescimento das plantas como altura, diâmetro, número de perfilhos e biomassa seca da parte aérea e raízes. Paralelamente, os compostos alelopáticos têm sido estudados por influenciarem o funcionamento estomatal, balanço hídrico, respiração, fotossíntese, entre outros fatores (EINHELLIG, 1986).

Segundo Marchiosi et *al*. (2016), os aleloquímicos podem influenciar indiretamente a regulação e manutenção estomática, através das condições da água, equilíbrio hormonal e absorção de íons. Esses autores consideraram também que a aplicação de L-DOPA pode provocar uma limitação não estomática na fotossíntese, devido ao fato desse composto influenciar negativamente o rendimento quântico efetivo do fluxo de elétrons através do FSII (Φ). Consideramos ainda, que os efeitos negativos provocados nas raízes observados no bioensaio de solo rizosfera (Figura 21) pode também ter contribuído na diminuição do crescimento radicular das MPB (Figura 17) o que pode ter auxiliado na redução do crescimento dessas plantas, sendo considerado um fator importante no efeito dessa planta.

Este estudo fornece evidências de alelopatia da mucuna-preta sob crescimento inicial de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. O estudo mostra efeitos negativos abrangendo aspectos fisiológicos e de crescimento. Para confirmar se esse potencial se expressa em condições naturais, outras abordagens experimentais são

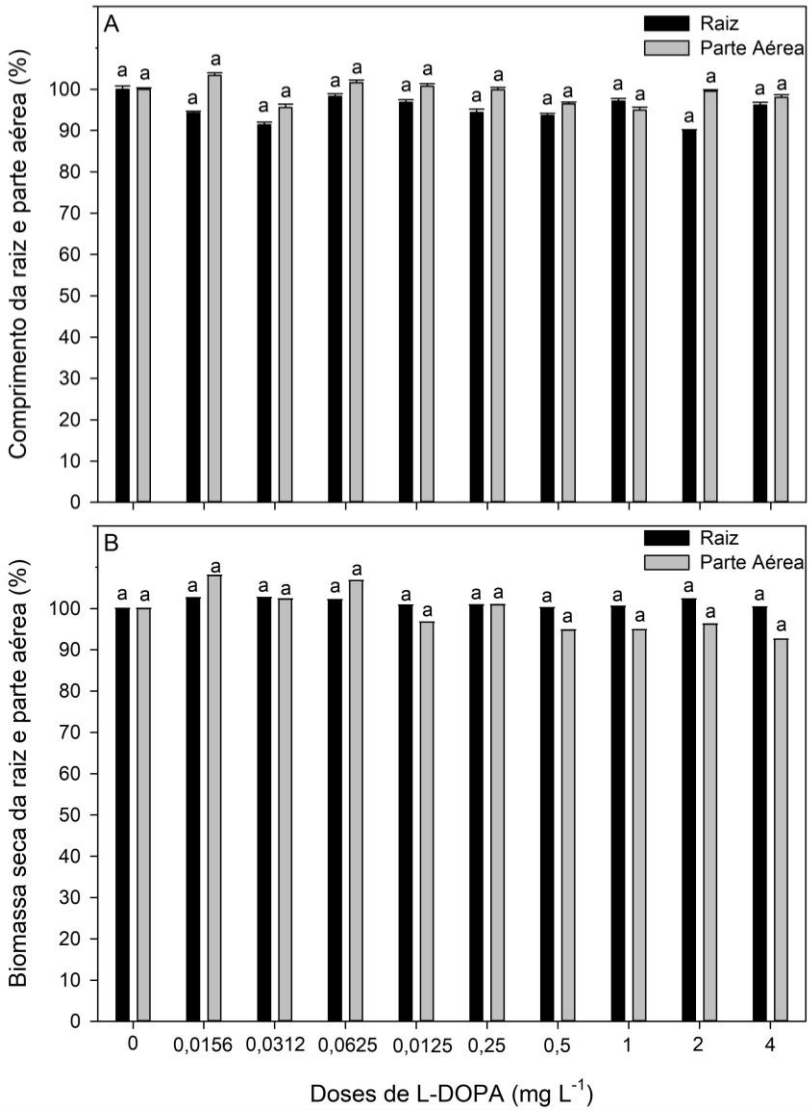
necessárias, sendo essenciais experimentos a campo, já que nessas condições os efeitos alelopáticos podem sofrer diversos mecanismos de interferência na natureza.

4.3 ESTUDO 3 - TROCAS GASOSAS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM PLANTAS DE CAPIM-BRAQUIÁRIA (*UROCHLOA DECUMBENS*) EXPOSTAS AO L-DOPA

4.3.1 Resultados - Efeito de aplicação foliar de L-DOPA no crescimento

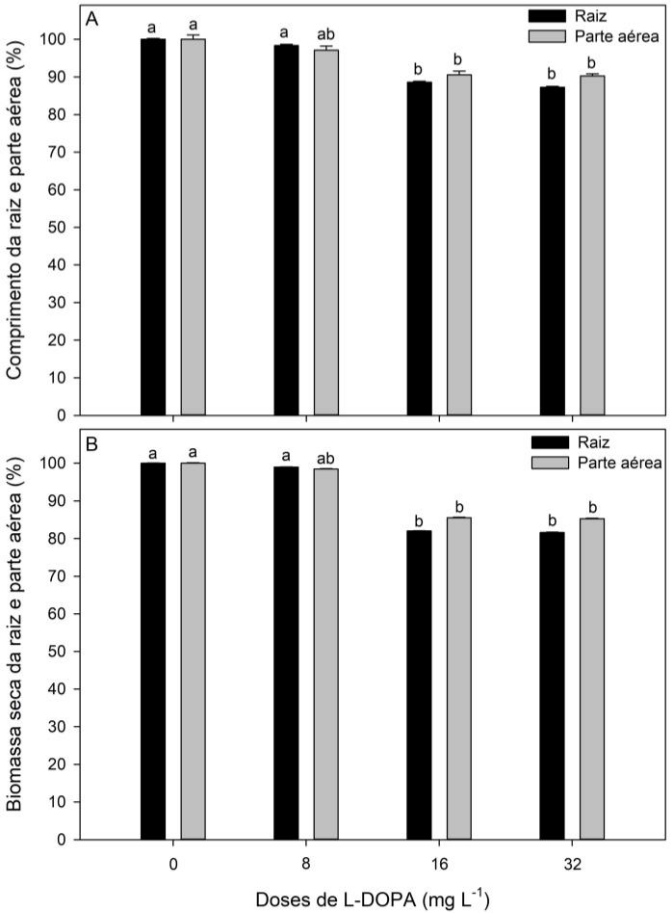
Ao analisar os efeitos das doses de L-DOPA sobre capim-braquiária observou-se que doses entre 0,0156 e 4 mg L^{-1} não afetaram o comprimento e biomassa seca da raiz e parte aérea dessas plantas (Figura 23). No entanto, no segundo experimento, utilizando-se doses maiores, ou seja, 16 e 32 mg L^{-1} provocaram a redução dessas variáveis, indicando maior sensibilidade do capim-braquiária a essas concentrações. De maneira geral, para essas duas doses, as reduções no comprimento da raiz e parte aérea foram de 12 e 10%, respectivamente, enquanto para a biomassa, de 18 e 15% (Figura 24). Os efeitos negativos para essas doses do L-DOPA podem ser verificados na Figura 25.

Figura 23 - Comprimento (A) e biomassa seca (B) da raiz e parte aérea de capim-braquiária submetidas a diferentes doses de L-DOPA (Experimento 1).



Médias seguidas por mesma letra dentro das diferentes partes da planta (raiz e parte aérea) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade para as diferentes doses de L-DOPA. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 6). Os valores representam a média de dois experimentos.

Figura 24 - Comprimento (A) e biomassa seca (B) da raiz e parte aérea de capim-braquiária submetidas a diferentes doses de L-DOPA (Experimento 2).



Médias seguidas por mesma letra dentro das diferentes partes da planta (raiz e parte aérea) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade para as diferentes doses de L-DOPA. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 6). Os valores representam a média de dois experimentos.

Figura 25 - Efeito de capim-braquiária submetidas as doses de L-DOPA (mg L^{-1}): 0, 8, 16 e 32.

Fonte: Roque de Carvalho Dias

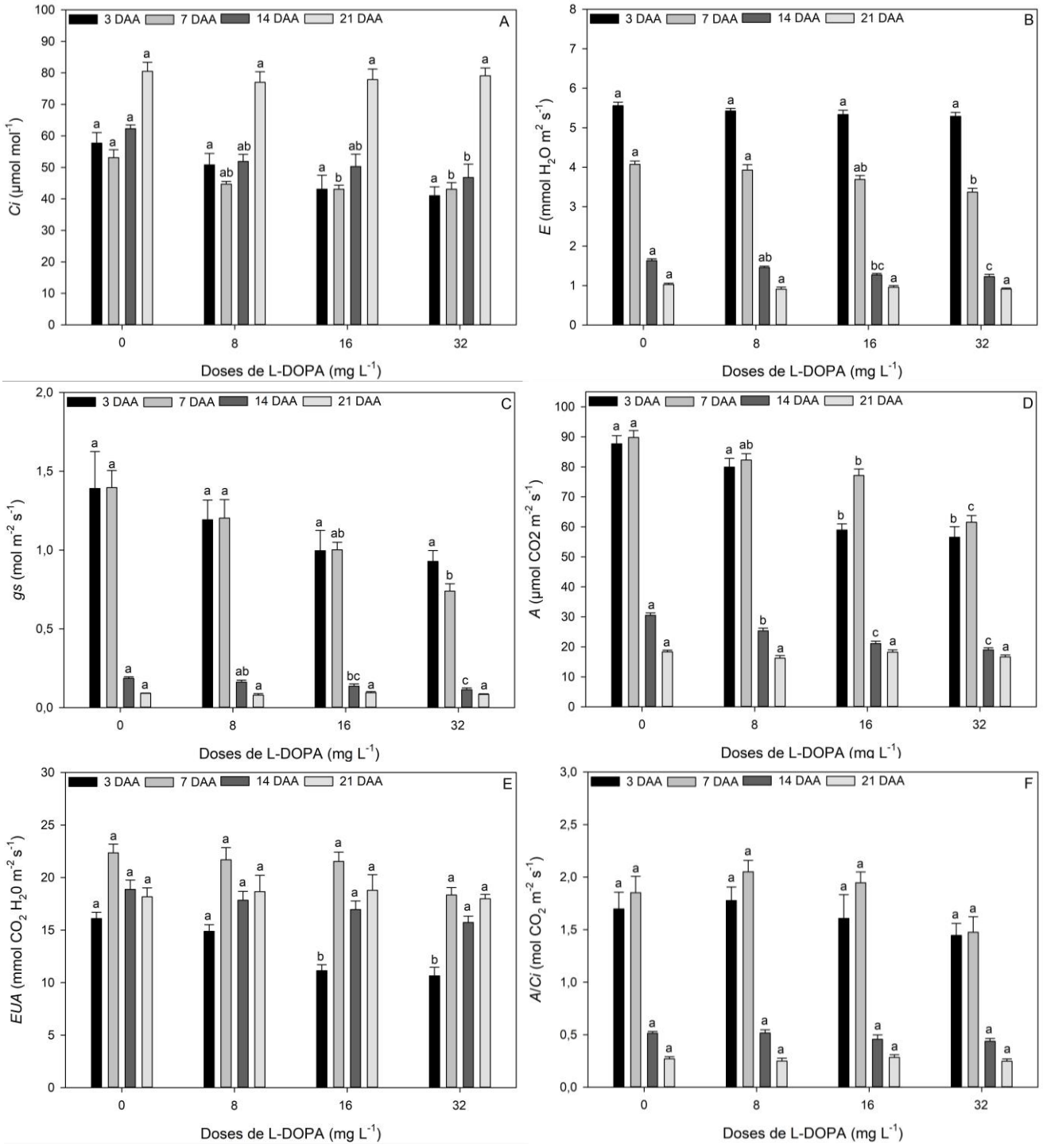
4.3.2 Resultados - Efeito de aplicação foliar de L-DOPA nas trocas gasosas

Da mesma forma, a aplicação foliar de L-DOPA reduziu os parâmetros relacionados as trocas gasosas em pelo menos um período avaliado, o que demonstra influência negativa desse composto nesse processo, exceto a *A*/*Ci*, (Figura 26). Os maiores decréscimos ocorreram nas doses de 16 e 32 mg L^{-1} de L-DOPA, confirmando que essas doses diminuíram o desenvolvimento das plantas no segundo experimento (4.3.1). Em relação as épocas e os componentes analisados, a *Ci*, *gs*, *E* e *A* foram reduzidas em pelo menos dois períodos analisados, com destaque para aos 7 e 14 DAA. Nesse sentido, vale destacar que o efeito não é permanente e crescente, corroborando com os efeitos observados anteriormente em MPB de cana-de-açúcar nos parâmetros de crescimento e trocas gasosas.

Quando aplicado 32 mg L^{-1} de L-DOPA via foliar, maior dose, aos 3 DAA, a *A* e *EUA* foram reduzidas em mais de 30% (Figura 26E e D). Já na segunda avaliação, a *Ci* e *E* (Figura 26A e B) apresentaram reduções próximas de 20%, enquanto a *gs* e *A* (Figura 26C e 4D) os decréscimos foram de 48 e 32%, respectivamente e no terceiro período avaliado, a *Ci* e *E* em 25% e *gs* e *A* em 30%. Esses resultados demonstram que a *Ci*, *gs*, *E* e *A* foram os parâmetros mais influenciados negativamente pelo L-DOPA em plantas de capim-braquiária.

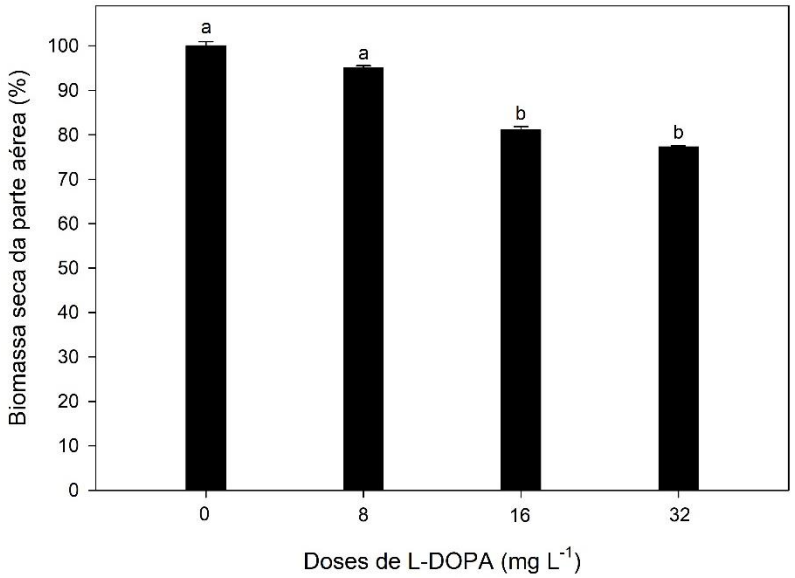
O acúmulo da biomassa da parte aérea do capim-braquiária foi influenciado pelo L-DOPA, sendo as doses de 16 e 32 mg L^{-1} responsáveis pela diminuição de 19 e 23%, respectivamente (Figura 27).

Figura 26 - Concentração interna de CO_2 (*Ci*), taxa de transpiração (*E*), condutância estomática (*gs*), taxa de assimilação líquida de CO_2 (*A*), uso eficiente da água (*EUA*) e eficiência instantânea de carboxilação (*A*/*Ci*) em muda plantas de capim-braquiária aos 3, 7, 14 e 21 dias após a aplicação (DAA) do L-DOPA.



Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade para as diferentes doses de L-dopa. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 5). Os valores representam a média de dois experimentos.

Figura 27 - Biomassa seca (%) da parte aérea de capim-braquiária submetidas a diferentes doses de L-DOPA.

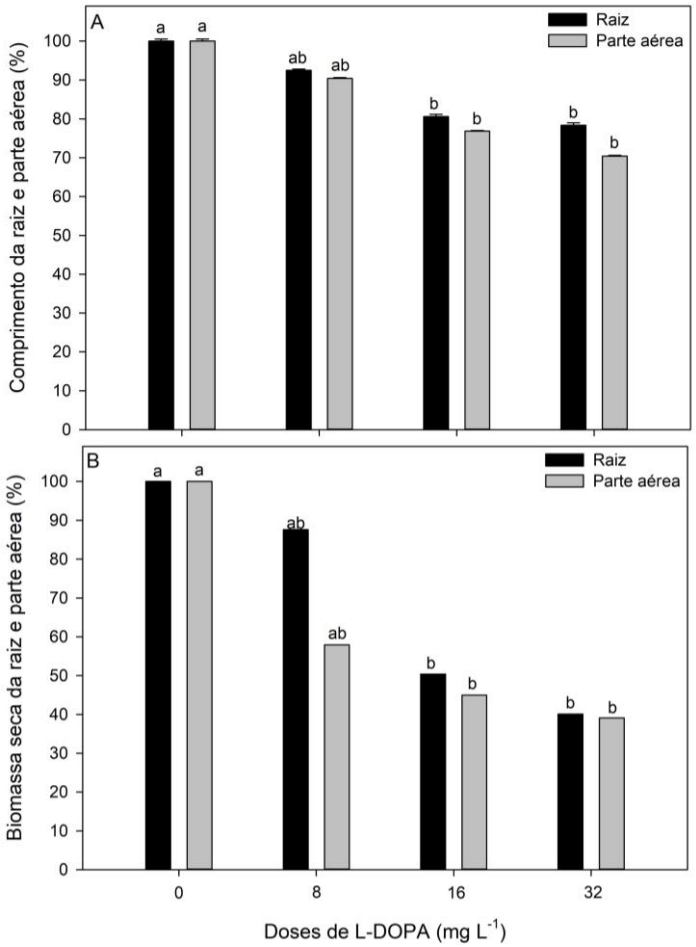


Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade para as diferentes doses de L-DOPA. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 5). Os valores representam a média de dois experimentos.

4.3.3 Resultados - Efeito do L-DOPA aplicado via solução nutritiva na atividade enzimática

Aplicação do L-DOPA via solução nutritiva através das raízes das plântulas de capim-braquiária reduziu o crescimento e biomassa seca da raiz e parte aérea, com destaque para as doses de 16 e 32 mg L^{-1} de L-DOPA (Figura 28). Além disso, esse decréscimo foi superior para essas variáveis em comparação a aplicação foliar. O comprimento radicular e da parte aérea nas concentrações de 16 e 32 mg L^{-1} de L-DOPA foi reduzido em 20 e 22% e 25 e 30%, respectivamente (Figura 28A). Para essas mesmas concentrações, os decréscimos na biomassa seca da raiz e parte aérea foram em geral de 50 e 60% e 55 e 60% (Figura 28B). Salienta-se que após a exposição do L-DOPA as plântulas de capim-braquiária houve o aparecimento da coloração preta nas raízes (Figura 29), como já evidenciado no ESTUDO 1 e 2, demonstrando concordância nos efeitos tanto quando utilizado a planta da mucuna-preta como o L-DOPA, seu principal composto. Assim, diante do exposto, destaca-se a importante atuação do L-DOPA e seus efeitos na redução no crescimento das plantas.

Figura 28 - Comprimento (A) e biomassa seca (B) da raiz e parte aérea de plântulas de capim-braquiária submetidas a diferentes doses de L-DOPA em solução nutritiva.



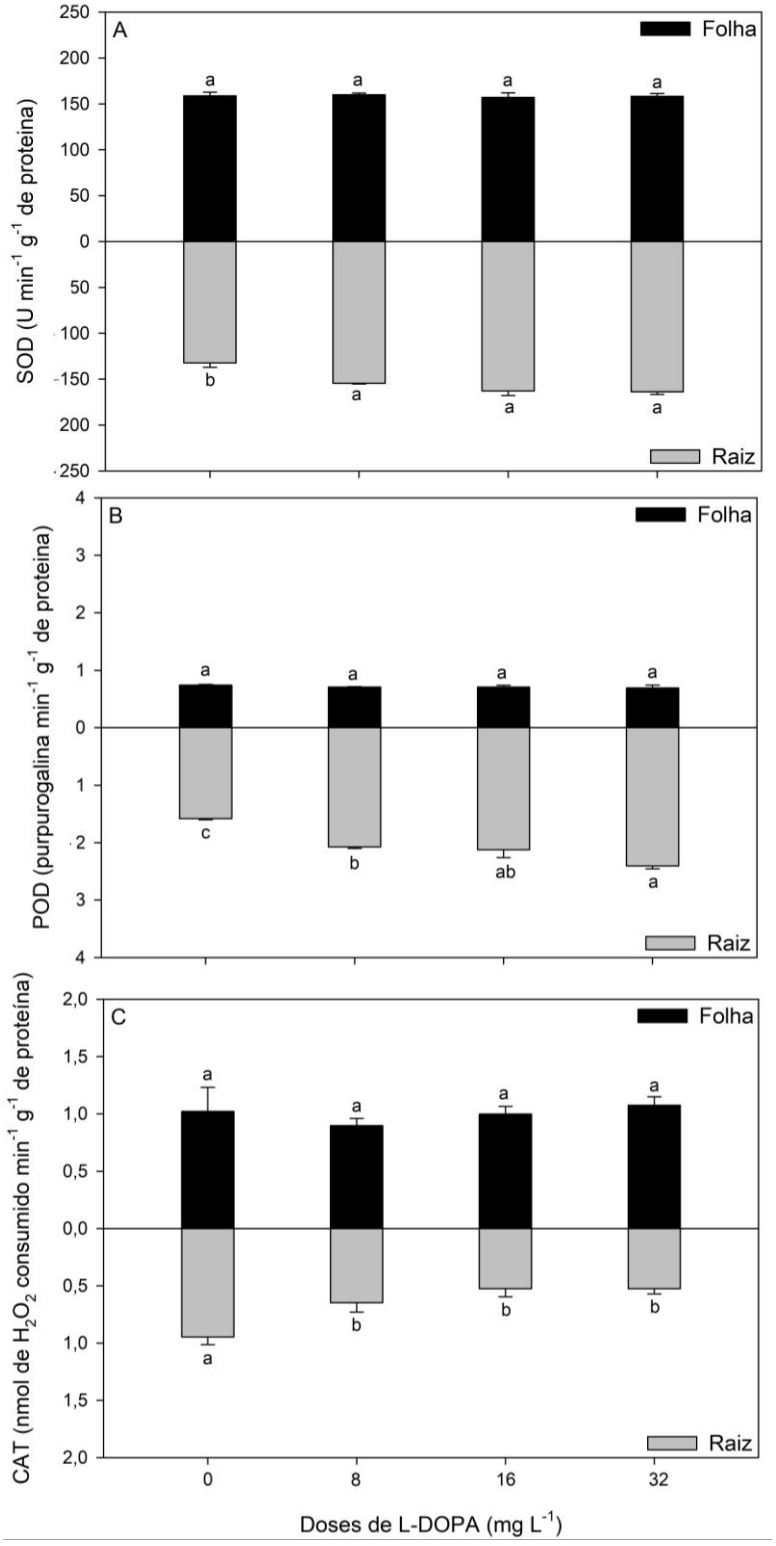
Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade para as diferentes doses de L-DOPA. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 5).

Figura 29 - Comparação da coloração da raiz em plântulas de capim-braquiária submetidas com 0 e 32 mg L^{-1} de L-DOPA.

Fonte: Roque de Carvalho Dias

A atividade enzimática analisada pela SOD, POD E CAT apresentaram diferenças nas raízes das plântulas de capim-braquiária, em contraste, nas folhas, não se verificou diferenças quando aplicado o L-DOPA (Figura 30). Além disso, para a SOD e POD, notou-se que com o aumento da dose do aleloquímico houve acréscimos também para essas enzimas (Figura 30A e B). Por outro lado, a tendência inversa ocorreu para CAT, ou seja, com o aumento das doses do L-DOPA houve diminuição na atividade dessa enzima (Figura 30C).

Figura 30 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (A), peroxidade (POD) catalase e catalase (CAT) em folha e raiz de capim-braquiária submetida a diferentes doses de L-DOPA.



Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 5).

4.3.4 Discussão

Uma das propriedades típicas dos compostos alelopáticos é apresentar efeito de inibição e/ou estímulo no crescimento em outras espécies. No presente trabalho, mostramos que o crescimento (comprimento e biomassa) de capim-braquiária foi significativamente afetado pelo L-DOPA principalmente nas doses de 16 e 32 mg L^{-1} (Figura 24 e 25). A redução no crescimento de plantas pela aplicação de L-DOPA em diferentes concentrações tem sido descrita em várias espécies (HACHINOHE; SUNOHARA; MATSUMOTO, 2004, NISHIHARA *et al*., 2004; TOPAL; KOCAÇALIŞKAN, 2006, SOARES *et al*., 2007, SOARES *et al*., 2011, SOARES *et al*., 2012, MUSHTAQ, SUNOHARA, MATSUMOTO, 2013, SIQUEIRA-SOARES *et al*., 2013), embora, algumas apresentam tolerância ao composto (NISHIHARA *et al*., 2004). Consideramos ainda, que o efeito de redução pode variar de acordo com o estádio de desenvolvimento da planta e o modo de aplicação, por exemplo. Assim, como o L-DOPA reduziu o crescimento do capim-braquiária, seu papel como potencial aleloquímico foi sustentado.

A diminuição do crescimento do capim-braquiária deve-se a toxicidade do L-DOPA através de sua metabolização (HACHINOHE; SUNOHARA; MATSUMOTO, 2004). Nesse processo, ocorre o aumento na produção de EROs, sendo responsável pelo efeito inibitório em plantas suscetíveis (HACHINOHE; MATSUMOTO, 2005, HACHINOHE; MATSUMOTO, 2007). As EROs são responsáveis por causar danos na membrana plasmática, macromoléculas como DNA e proteínas (APEL; HIRT, 2004). Além disso, fatores relacionados a lignificação e enzimas relacionadas a esse processo parecem estar relacionadas as repostas de diminuição de crescimento de plantas após a aplicação de L-DOPA (SOARES *et al*., 2007, SOARES *et al*., 2012, SIQUEIRA-SOARES *et al*., 2013, BIDO *et al*., 2018, MARCHIOSI *et al*., 2020).

Em espécies de plantas daninhas, *Sinapis arvensis* L., *Cirsium arvense* L., *Papaver rhoeas* L. e *Lamium amplexicaule* L., o comprimento da raiz e parte área e biomassa fresca foram reduzidos após a aplicação de 750, 1500 e 3000 mg L^{-1} de L-DOPA (TOPAL; KOCAÇALIŞKAN, 2006). Nesse estudo, seguindo a ordem das espécies citadas anteriormente, as reduções na maior dose aplicada, para o comprimento da raiz foi de 34, 33, 56 e 43%, para o comprimento da parte aérea 13, 34, 34 e 30% e biomassa fresca 43, 66, 80 e 18%, corroborando com as porcentagens de redução encontradas no presente trabalho. Destacando ainda, que o comprimento

da raiz foi a variável mais afetada em comparação a parte aérea, demonstrando maior influência nessa estrutura, resultado compatível com a nossa pesquisa.

Ademais, o L-DOPA não acarretou a morte das plantas em nossos trabalhos, concordando com os trabalhos citados anteriormente. Contudo, consideramos que o efeito em diminuir o crescimento das plantas, pode ser adotado como uma ferramenta importante dentro do manejo de plantas daninhas, podendo facilitar o controle dessas plantas em associação a outros métodos.

Nas avaliações de trocas gasosas verificou-se decréscimos a partir dos 3 DAA com destaque para as avaliações de *Ci*, *gs*, *E* e *A* (Figura 26). O efeito inibitório de compostos alelopáticos sobre a fotossíntese tem sido estudado e estes podem influenciar o funcionamento estomatal, balanço hídrico, respiração e fotossíntese (EINHELLING, 1986).

O acesso de CO_2 atmosférico às células fotossintéticas do mesofilo ocorre por meio da abertura estomática e, portanto, variações na *gs* podem afetar tanto a *A* como a *E* (TAIZ *et al*., 2017). A *Ci* é influenciada por fatores que reduzem o influxo de CO_2 para o espaço interno das folhas devido a alguma limitação estomática. Isso geralmente ocorre pelo fechamento dos estômatos, gerados por condições ambientais como disponibilidade hídrica, luz e energia, entre outros (TAIZ *et al*., 2017). Além disso, segundo Zhou e Yu, (2006), os aleloquímicos também podem provocar determinada limitação estomática, que é acompanhada pela concentração interna de carbono representando efeitos negativos à assimilação de CO_2.

Outro ponto importante, a *Ci* também pode ser alterada pelas espécies reativas de oxigênio, que atuam como mensageiros secundários na ativação de canais da membrana plasmática, possibilitando o influxo de cálcio, que se concentra no citosol causando fechamento estomático (TAIZ *et al*., 2017), reduzindo assim a *gs* (menor influxo de CO_2). Essas informações corroboram com os encontrados para *gs* nesse trabalho, na qual o aumento das doses do L-DOPA provocou uma diminuição nessa variável (Figura 26 C). Os decréscimos da *gs* pode ser devido ao fechamento dos estômatos provocado pelo L-DOPA, estando em acordo com Marchiosi *et al*. (2016), que verificaram redução no fechamento estomático em plantas de soja após a aplicação de L-DOPA.

As menores taxas na *E* são provocadas pelos baixos valores da *gs* e, segundo Lima *et al*. (2010), o comportamento estomático determina a demanda transpirativa a que as folhas estão potencialmente sujeitas, controlando sua perda de H_2O para o

ambiente na forma de vapor de água. A *A* é influenciada por diversos fatores como: a diferença de concentração de CO_2 nos espaços intercelulares e extracelular, o grau de abertura estomática e com a turgescência tanto das células-guarda (que controlam a abertura dos estômatos) como das células epidérmicas dos estômatos (MESSINGER; BUCKLEY; MOTT, 2006). Neste sentido, qualquer efeito, causado pelo L-DOPA avaliado, que leve à alguma restrição devido à limitação estomática e/ou interferência nas reações de assimilação de CO_2 promove a redução da *A*. Segundo Marchiosi *et al*. (2016), plantas de soja submetidas a aplicação de L-DOPA tiveram valores reduzidos na *E* e *A* e essa redução atribuiu-se também à limitação estomática e/ou interferência nas reações de assimilação de CO_2. Esses autores, consideraram ainda que o L-DOPA, a longo prazo de exposição, pode provocar uma limitação não estomática na fotossíntese, devido ao fato desse composto influenciar negativamente o rendimento quântico efetivo do fluxo de elétrons através do FSII (Φ).

Assim, a balanço entre a fotossíntese e a respiração determina a quantidade de fotoassimilados necessários para o crescimento normal da planta. Por isso, se algo prejudicar este balanço, pode haver consequências negativas no crescimento, o que explica a menor biomassa seca (Figura 27) em plantas de capim-braquiária após a aplicação de L-DOPA.

Na atividade enzimática contatou-se diferenças sob a aplicação de L-DOPA em determinadas enzimas e nos diferentes órgãos da planta, raiz e folha (Figura 30). Além disso, houve redução no crescimento das plântulas de capim-braquiária, sendo avaliados o comprimento e biomassa seca da raiz e parte aérea (Figura 28). Tanto a atividade da SOD quanto a POD na raiz aumentaram quando as plântulas de capim-braquiária foram submetidas a diferentes concentrações de L-DOPA (Figura 30A e B). Ademais, pode-se notar uma maior atividade dessas enzimas nas raízes em comparação as folhas. Entretanto, a atividade da CAT foi reduzida em relação a aplicação do L-DOPA e sua maior atividade foi verificada nas folhas (Figura 30C). Sob estresse bióticos e abióticos, as plantas respondem através da regulação da expressão gênica e vias metabólicas (REN *et al*., 2018). As plantas são capazes de ajustar a atividade dos sistemas de enzimas antioxidantes (SOD, POD e CAT) para remover o excesso de radicais livres de oxigênio e alcançar a autoproteção (ALSHER; ERTURK; HEATH, 2002).

As enzimas SOD atuam na primeira linha de defesa contra as EROs, sendo capazes de dismutar o superóxido (O^{2-}) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no

cloroplasto, citoplasma e peroxissomo (SCANDALIOS, 1993; GILL; TUTEJA, 2010, BARBOSA *et al*., 2014). Enquanto a POD e CAT desempenham papel fundamental na eliminação do peróxido de hidrogênio, sendo a catalase uma das principais enzimas de eliminação de H_2O_2 (SIEGEL, 1993, BREUSEGEM *et al*., 2001; GILL; TUTEJA, 2010, BARBOSA *et al*., 2014). Os dados expostos podem ser resultados do estresse oxidativo gerados pelas EROs na metabolização do L-DOPA, como citado anteriormente.

O aumento dessas enzimas antioxidantes após a aplicação de L-DOPA também foram relatadas em raízes de soja SOARES *et al*., 2007, SOARES *et al*., 2011, SOARES *et al*., 2012) e milho (SIQUEIRA-SOARES *et al*., 2013). A redução da CAT pode ser explicada pelos baixos níveis de H_2O_2 devido a atuação da SOD e POD. SOARES *et al*. (2011) verificaram aumento na atividade de SOD e POD e diminuição de CAT após aplicação de L-DOPA. Esses autores consideraram que há um equilíbrio coordenado na atividade dessas enzimas antioxidantes. Em geral, quando algumas enzimas antioxidantes são reduzidas outras são reguladas positivamente (APEL; HIRT, 2004). Assim, sugerimos que o sistema enzimático antioxidante está relacionado ao aumento das EROs provocado pela aplicação de L-DOPA.

Destacamos ainda, que há poucos trabalhos na literatura que avaliaram o efeito do L-DOPA em solução nutritiva e pulverizado em plantas. O L-DOPA apresenta ação inseticida e na supressão de nematoides (MARCHIOSI *et al*., 2020), portanto, o uso de mucuna-preta, fonte do aleloquímico, nos sistemas de produção precisa ser considerado dentro de programa integrado de plantas daninhas, não apenas pelos efeitos de competição, mas também pela alelopatia. Igualmente, é importante considerar seu efeito em culturas, devido os potenciais prejuízos decorrentes da exposição ao aleloquímico.

Este estudo fornece evidências de que o L-DOPA reduz as trocas gasosas e aumenta a quantidade das EROs e estes podem ser a principal causa de redução no crescimento em capim-braquiária. Mais estudos são necessários para elucidar o metabolismo do L-DOPA em diferentes espécies de plantas associado a diferentes métodos de aplicação, dose e estádio.

5 CONCLUSÕES

A mucuna-preta (*Mucuna pruriens* var. *utilis*) apresenta alelopatia pelo método de extrato aquoso e sanduíche, sendo seu efeito seguido na ordem folhas > raiz > caule.

Em solo previamente cultivado com mucuna-preta houve redução no crescimento inicial e trocas gasosas de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar.

A aplicação foliar de 16 e 32 mg L^{-1} de L-DOPA reduziu o crescimento e as trocas gasosas das plantas de *U*. *decumbens*.

Doses com 16 e 32 mg L^{-1} de L-DOPA aplicado via raiz diminuiu o crescimento de *U*. *decumbens* e aumentou a atividade enzimática da SOD e POD nas raízes.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, S. R. *et al*. Efeito fitotóxico de *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae) em diferentes tempos de coleta. **Iheringia. Série Botânica**, v. 71, n. 2, p. 175-183, 2016.

ALMEIDA, K. D.; CÂMARA, F. L. A. Preparados homeopáticos e adubação verde no controle de *Cyperus rotundus* L. **Revista Ceres**, v. 59, n. 3, p. 422-426, 2012.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role os superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signaling transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373, 2004.

APPIAH, K. S.; AMOATEY, C. A.; FUJII, Y. Allelopathic activities of selected *Mucuna pruriens* on the germination and initial growth of lettuce. **International Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 475-481, 2015.

ARIVALAGA, M. *et al*. Variability in biochemical and mineral composition of *Mucuna pruriens* (L.) DC. - An underutilized tropical legume. **Legume Research: An International Journal**, v. 37, n. 5, p. 483-491, 2014.

AZANIA, C. A. M. *et al*. Manejo químico de Convolvulaceae e Euphorbiaceae em cana-de-açúcar em período de estiagem. **Planta Daninha**, v. 27, n. 4, p. 841-848, 2009.

BALOGUN, I. O.; OLATIDOYE, O. P. Chemical composition and nutritional evaluation of velvet bean seeds (*Mucuna utilis*) for domestic consumption and industrial utilization in Nigeria. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 11, n. 2, p. 116-122, 2012.

BARBOSA, M. R. *et al*. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BARBOSA, J. *et al*. Manejo da mucuna-preta na supressão de plantas daninhas na cultura da alface-crespa. **Journal of Neotropical Agriculture**, v. 5, n. 2, p. 13-18, 2018.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase improved as says and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.

BERNARD, O. E.; UDENSI, U. E. Evaluation of potential allelopathic relationship between Velvet bean (*Mucuna cochinchinensis* (Lour.) A. Chevand Speargrass (*Imperata cylindrical* (L.) Raeushel) with Selected Methods. **Journal of Agriculture and Ecology Research International**, v. 3, n. 3, p. 89-96, 2015.

BIDO, G. S. *et al*. Comparative effects of L-DOPA and velvet bean seed extract on soybean lignification. **Plant Signaling & Behavior**, v. 13, n. 4, p. e1451705, 2018.

BLUM, U.; SHAFER, S. R.; LEHMAN, M. E. Evidence for inhibitory allelopathic interactions involving phenolic acids in field soils: concepts vs. an experimental model. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 5, p. 673-693, 1999.

BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MS, 2009.

BREUSEGEM, F. V. *et al*. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.

BRESSANIN, F. N. *et al*. Interference periods of velvet bean in sugarcane. **Ciência Rural**, v. 46, n. 8, p. 1329-1337, 2016.

BRIGHENTI, A. M.; OLIVEIRA, M. F. Biologia de plantas daninhas. In: OLIVEIRA JR., R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (Org.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. p. 1-36.

CALABRESI, P. *et al*. Levodopa-induced plasticity: a double-edged sword in Parkinson's disease? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1672, p. 20140184, 2015.

CARSKY, R. J.; BECKER, M.; HAUSER, S. Mucuna cover crop fallow systems: potential and limitations. **Sustaining soil fertility in West Africa**, v. 58, p. 111-135, 2001.

CASSANI, E. *et al*. *Mucuna pruriens* for Parkinson's disease: low-cost preparation method, laboratory measures and pharmacokinetics profile. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 365, p. 175-180, 2016.

CENTENARO, C. *et al*. Contribuição ao estudo alelopático de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1, p. 304-308, 2009.

CHENG, F.; CHENG, Z. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-16, 2015.

CHINAPOLAIAH, A. *et al*. Variability in L-Dopa and other biochemical composition of *Mucuna pruriens* (L.) an underutilized tropical legume. **Industrial Crops and Products**, v. 138, n.5, p. 111447, 2019.

CILIA, R. *et al*. Daily intake of Mucuna pruriens in advanced Parkinson's disease: a 16-week, noninferiority, randomized, crossover, pilot study. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 49, p. 60-66, 2018.

CONCENÇO, G. *et al*. Ciência das plantas daninhas: histórico, biologia, ecologia e fisiologia. In: MONQUERO, P.A. (Ed.). **Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas**. São Carlos: Editora Rima – SBCPD, 2014. p.1-29.

COSTA, E. C. *et al*. Allelopathic potential of *Crysopogon zizanioides* (L.) and *Paspalum millegrana* (Schrad) on the germination of lettuce. **Iheringia**, **Série Botânica**, v. 75, p. e2020002, 2020.

DEMUNER, A. J. *et al*. Isolamento e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos de *Mucuna cinerea* contra *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 335-339, 2003.

DUKE, J. A. **Handbook of legumes of world economic importance**. New York: Plenum Press, 1981. p. 170-173.

EINHELLIG, F. A. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: PUTNAM,A.R.; TANG, C. S. **The Science of Allelopathy**. New York: John Wiley and Sons, Inc.,1986. p.171-188.

EINHELLIG, F. A. Allelopathy: Current status and future goals. In: INDERJIT, S.; DAKSHINI, K. M. M.; EINHELLIG, F. A. (Eds.). **Allelopathy: Organisms, processes and applications**. Washington, EUA: American Chemical Society, 1995. p. 1-24.

EINHELLIG, F.A. The physiology of allelochemical action: Clues and views. In: REIGOSA, M.; PEDROL, N. **Allelopathy from Molecules to Ecosystems**. Vigo: Universidade de Vigo, 2002. p.1-23.

EMBRAPA. 2013. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa Agropecuária de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3.d. Brasília: Embrapa Solos. 342p.

ERASMO, E. A. L. *et al*. Efeito de extratos de adubos verdes sobre *Lactuca sativa* e *Digitaria horizontalis*. **Bragantia**, v. 70, n. 3, p. 529-537, 2011.

FAVERO, C. Modificações na população de plantas espontâneas na presença de adubos verdes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, v. 11, p. 1355-1362, 2001.

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, A. G.; BORGUETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323p.

FUJII, Y.; SHIBUYA, T.; YASUDA, T. L-3, 4-Dihydroxyphenylalanine as an allelochemical candidate from *Mucuna pruriens* (L.) DC. var. *utilis*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 617-618, 1991.

FUJII, Y.; SHIBUYA, T.; YASUDA, T. Allelopathy of velvetbean: Its discrimination and identification of L-DOPA as a candidate of allelopathic substances. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 25, n. 4, p. 238-247, 1992.

FUJII, Y. Allelopathy of velvetbean: determination and identification of L-DOPA as a candidate of allelopathic substances. In: Cutler HG, Cutler SJ (eds) **Biologically Active Natural Products: Agrochemicals**. CRC Press, Boca Raton, p. 33-47, 1999.

FUJII, Y. Allelopathy in the natural and agricultural ecosystem and isolation of potent allelochemicals from velvet bean (*Mucuna pruriens*) and hairy vetch (*Vicia villosa*). **Biological Science in Space**, v. 17, n. 1, p. 6-13, 2003.

FUJII, Y. *et al*. Assessment method for allelopathic effect from leaf litter leachates. **Weed Biology and Management**, v. 4, n. 1, p. 19-23, 2004.

FUJII, Y.; FURUBAYASHI, A.; HIRADATE, S. Rhizosphere soil method: a new bioassay to evaluate allelopathy in the field. In: **Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy: Establishing the Scientific Base**. p. 21-26, 2005.

FURUBAYASHI, A.; HIRADATE, S.; FUJII, Y. Adsorption and transformation reactions of L-DOPA in soils. **Soil Science & Plant Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 819-825, 2005.

GARCIA, V. A. *et al*. Extraction of Mucuna seed oil using supercritical carbon dioxide to increase the concentration of L-Dopa in the defatted meal. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 69, p. 75-81, 2012.

GAO, X. *et al*. Allelopathic eff ects of *Hemistepta lyrata* on the germination and growth of wheat, sorghum, cucumber, rape, and radish seeds. **Weed Biology and Management**, v. 9, n. 3, p. 243-249, 2009.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plan Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

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

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

HACHINOHE, M.; SUNOHARA, Y.; MATSUMOTO, H. Absorption, translocation and metabolism of L-DOPA in barnyard grass and lettuce: their involvement in species-selective phytotoxic action. **Plant Growth Regulation**, v. 43, n. 3, p. 237-243, 2004.

HACHINOHE, M.; MATSUMOTO, H. Involvement of reactive oxygen species generated from melanin synthesis pathway in phytotoxic action of L-DOPA. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 2, p. 237-246, 2005.

HACHINOHE, M.; MATSUMOTO, H. Involvement of melanin synthesis and reactive oxygen species in phytotoxic action of L-DOPA in carrot cells. **Crop Protection**, v. 26, n. 3, p. 294-298, 2007.

HACHINOHE, M.; MATSUMOTO, H. Mechanism of selective phytotoxicity of L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-Dopa) in barnyardglass and lettuce. Journal of Chemical Ecology, v. 33, n. 10, p. 1919-1926, 2007.

HADDAD, F. *et al*. Dopamine and levodopa prodrugs for the treatment of Parkinson's disease. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 40, 2017.

HERRMANN, K. M. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 907-919, 1995.

HOAGLAND, D. R.; ARNON D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California agricultural experiment station**, v. 347, n. 2, 1950.

ILDIS - **International Legume Database & Information Service**. Disponível em: http://www.ildis.org/LegumeWeb/. Acesso em: 02 jul. 2022.

INDERJIT; DEL MORAL, R. Is separating resource competition from allelopathy realistic? **The Botanical Review**, v. 63, n. 3, p. 221-230, 1997.

INDERJIT; CALLAWAY R. M. Experimental designs for the study of allelopathy. **Plant and Soil**, v. 256, n. 1, p. 1-11, 2003.

INDERJIT; DUKE S. O. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta**, v. 217, n. 4, p. 529-539, 2003.

INDERJIT. Experimental complexities in evaluating the allelopathic activities in laboratory bioassays: A case study. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 256-262, 2006.

JORGE, M. A *et al*. Mucuna species: recent advances in application of biotechnology. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology, Global Science Books**, v. 1, p. 80-94, 2007.

KAIIRA, M. G. *et al*. Allelopathic potential of compounds in selected crops. **Journal of Agricultural Science**, v. 13, n. 9, p. 192-201, 2021a.

KAIIRA, M. G. *et al*. Production Potential of Allelopathic Rice, *Cymbopogon*, *Desmodium*, *Mucuna* and Maize. **Journal of Agricultural Science**, v. 13, n. 9, p. 202-212, 2021b.

KAIIRA, M. G. *et al*. Profiles of compounds in stover of rice, cymbopogon, desmodium, mucuna and maize. **African Crop Science Journal**, v. 13, n. 9, p. 184-191, 2021c.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.

LAMEGO, F. P. *et al*. Potencial de supressão de plantas daninhas por plantas de cobertura de verão. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 1, p. 97-105, 2015.

LAMPARIELLO, L. R. et al. The magic velvet bean of *Mucuna pruriens*. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 2, n. 4, p. 331-339, 2012.

LIMA, M. E. *et al*. Desempenho do cultivo da berinjela em plantio direto submetida a diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, p. 604-610, 2012.

MAHÉ, I. *et al*. Deciphering field-based evidences for crop allelopathy in weed regulation. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 42, n. 3, p. 1-20, 2022.

MARCHIOSI, R. *et al*. Photosynthetic response of soybean to L-DOPA and aqueous extracts of velvet bean. **Plant Growth Regulation**, v. 80, n. 2, p. 171-182, 2016.

MARCHIOSI, R. *et al*. L-DOPA and dopamine in plant metabolism. **In Neurotransmitters in Plant Signaling and Communication**. Signaling and Communication in Plants, eds BALUŠKA, F.; MUKHERJEE, S.; RAMAKRISHNA, A. (Cham: Springer), 141-167, 2020.

MASCARENHAS, M. H. T. *et al*. Efeito de culturas antecessoras à cana-de-açúcar na composição florística de plantas daninhas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 11, n. 2, p. 241-248, 2012.

MATIAS, R. *et al*. Potencial alelopático de extratos etanólicos e pó de folhas de *Tapirira obtusa* na germinação e formação de plântulas de diferentes espécies-alvo. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e2521041384, 2021.
MESSINGER, S. M.; BUCKLEY, T. N.; MOTT, K. A. Evidence for involvement of photosynthetic processes in the stomatal response to CO_2. **Plant Physiology**, v. 140, n. 2, p. 771-778, 2006
MONQUERO, P. A. *et al*. Efeito de adubos verdes na supressão de espécies de plantas daninhas. **Planta daninha**, v. 27, n. 1, p. 85-95, 2009.
MOSHAROV, E. V.; BORGKVIST, A.; SULZER, D. Presynaptic effects of levodopa and their possible role in dyskinesia. **Movement Disorders**, v. 30, n. 1, p. 45-53, 2015.

MOURA, T. M. *et al*. A new infrageneric classification of Mucuna (Leguminosae-Papilionoideae): supported by morphology, molecular phylogeny and biogeography. **Systematic Botany**, v. 41, n. 3, p. 606-616, 2016.

MOURA, T. M. *et al*. A revision of the neotropical Mucuna species (Leguminosae-Papilionoideae). **Phytotaxa**, v. 337, n. 1, p. 1-65, 2018.

MUSHTAQ, M. N.; SUNOHARA, Y.; MATSUMOTO, H. Allelochemical L-DOPA induces quinoprotein adducts and inhibits NADH dehydrogenase activity and root growth of cucumber. **Plant Physiology and Biochemistry**, 70, 374-378, 2013.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D., CARVALHO, N.M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.49-85.

NAKAGAWA, J. *et al*. Consorciação e plantas daninhas afetando a produtividade e a qualidade de sementes de sorgo. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 2, p. 52-56, 2009.

NISHIHARA, E. *et al*. Germination growth response of different plant species to the allelochemical L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). **Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 2, p. 181-189, 2004.

OLIVEIRA, A. K. M. *et al*. Leaf extract effects of *Vochysia divergenson* lettuce and tomato. **Allelopathy Journal**, v. 31, n. 1, p. 129-138, 2013.

PATTISON, D. I.; DEAN, R. T.; DAVIS, M. J. Oxidation of DNA, proteins and lipids by DOPA, protein-bound DOPA, and related catechol (amine) s. **Toxicology**, v. 177, n. 1, p. 23-37, 2002.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.

PETTER, F, A. *et al*. Uso de plantas de cobertura como ferramenta na estratégia de manejo de capim-amargoso. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 14, n. 3, p. 200-209, 2015.

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

PITELLI, R. A. O termo planta-daninha. **Planta Daninha**, v. 33, n.3, p. 622-623, 2015.

SILVA, P. R. F. D. Estratégias de manejo de coberturas de solo no inverno para cultivo do milho em sucessão no sistema semeadura direta. **Ciência Rural**, v. 36, n.3, p. 1011-1020, 2006.

PRAKASH, D.; NIRANJAN, A.; TEWARI S. K. Some nutritional properties of the seeds of three *Mucuna species*. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 52, n. 1, p. 79-82, 2001.

PUGALENTHI, M.; VADIVEL, V.; SIDDHURAJU, P. Alternative food/feed perspectives of an underutilized legume *Mucuna pruriens* var. utilis - a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 60, n. 4, p. 201-218, 2005.

QASEM, J. R. A new technology separating allelopathy from competition in pot experiments. **International Journal of Agricultural Science and Food Technology**, v. 3, n. 1, p. 19-25, 2017.

RAINA, A. P.; KHATRI, R. Quantitative determination of L-DOPA in seeds of *Mucuna pruriens* germplasm by high performance thin layer chromatography. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, n. 4, p. 459, 2011.

RAINA, A. P.; TOMAR, J. B.; DUTTA, M. Variability in *Mucuna pruriens* L. germplasm for L-Dopa, an anti-parkinsonian agent. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, n. 6, p. 1207-1212, 2012.

RANKRAPE, C. B. *et al*. The effect of velvet bean (*Mucuna cinereum*) extract on seedling growth of winter cereals. **African Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 23, p. 1170-1176, 2018.

REIGOSA, M. *et al*. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 4, p. 629-646, 2013.

REN, K.; HAYAT, S.; QI, X.; LIU, T.; CHENG, Z. The garlic allelochemical DADS influences cucumber root growth involved in regulating hormone levels and modulating cell cycling. **Journal of Plant Physiology**, v. 230, p. 51-60, 2018.

RIBEIRO, J. P. N. *et al*. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de *Crinum americanum* L. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 1, p. 183-188. 2009.

RICE, E. L. **Allelopathy**. Academic Press, New York, 1984, p.353p.

RIZZI, E. S. *et al*. Allelopathic potential and phytochemistry of cambarazinho (*Vochysia haenkeana* (Spreng.) Mart.) leaves in the germination and development of lettuce and tomato. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 1, p. 98-107, 2016.

RUGARE, J. T.; PIETERSE, P. J.; MABASA, S. Effects of green manure cover crops (*Canavalia ensiformis* L. and *Mucuna pruriens* L.) on seed germination and seedling growth of maize and *Eleusine indica* L. and *Bidens pilosa* L. weeds. **Allelopathy Journal**, v. 50, n. 1, p. 121-139, 2020.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7- 12, 1993.

SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases - an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, v.12, p.303-312, 1993.

SHIPLEY, B.; PARENT, M. Germination responses of 64 wetland species in relation to seed size, minimumtime to reproduction and seedling relative growth rate. **Functional Ecology**, v. 5, n. 1, p. 111-118, 1991.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Rapid reversed-phase high performance liquid chromatographic method for the quantification of L-Dopa (L-3, 4-dihydroxyphenylalanine), non-methylated and methylated tetrahydroisoquinoline compounds from Mucuna beans. **Food chemistry**, v. 72, n. 3, p. 389-394, 2001.

SILVA, I. A. B. *et al*. Interferência de uma comunidade de plantas daninhas com predominância de *Ipomoea hederifolia* na cana-soca. **Planta Daninha**, v. 27, n. 2, p. 265-272, 2009.

SILVA, I. A. B. *et al*. Overcoming depth sowing and mulch density in *Mucuna aterrima*, *Mucuna deeringiana* and *Mucuna cinerea*. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 313-317, 2013.

SILVA, E. *et al*. Qual o nível de competição da mucuna-preta com a cultura do amendoim? **South American Sciences**, v. 1, n. 2, p. e2039-e2039, 2020.

SIQUEIRA-SOARES, R. C. *et al*. Root growth and enzymes related to the lignification of maize seedlings exposed to the allelochemical L-DOPA. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 12-13, 2013.

SOARES, A. R. *et al*. L-DOPA increases lignification associated with Glycine max root growth-inhibition. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, n. 2, p. 265-275, 2007.

SOARES, A. R. *et al*. The allelochemical L-DOPA increases melanin production and reduces reactive oxygen species in soybean roots. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, n. 8, p. 891-898, 2011.

SOARES, A. R. *et al*. The effects of L-DOPA on root growth, lignification and enzyme activity in soybean seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 5, p. 1811-1817, 2012.

SOARES, A. R. *et al*. The role of L-DOPA in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 9, n. 4, p. e28275, 2014.

SOUZA, C. L. M. *et al*. Efeito inibidor dos extratos hidroalcóolicos de coberturas mortas sobre a germinação de sementes de cenoura e alface. **Planta Daninha**, v. 17, n. 2, p. 263-271, 1999.

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

SOUZA, G. C. et al. Germinação de sementes de mucuna-preta submetidas a diferentes períodos de armazenamento. **Revista Brasileira de Energia Renováveis**, v. 4, p. 72-83, 2015.

TAIZ, L. *et al*. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal** (6 ed., 858p). Porto Alegre, RS: Artmed., 2017.

TARAWALI, G. *et al*. Adoption of improved fallows in West Africa: lessons from mucuna and stylo case studies. **Agroforestry Systems**, v. 47, n. 1, p. 93-122, 1999.

TEODORO, R. B. *et al*. Aspectos agronômicos de leguminosas para adubação verde no cerrado do alto vale do Jequitinhonha. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 2, p. 635-643, 2011.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science**, v. 153, n. 1, p. 65-72, 2000.

TEIXEIRA, C. M.; ARAÚJO, J. B. S.; CARVALHO, G. J. D. Cover plants allelopathic potential in *Bidens pilosa* L. control. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 3, p. 691-695, 2004.

TOPAL, S.; KOCAÇALIŞKAN, İ. Allelopathic effects of DOPA against four weed species. **Journal of Science and Technology of Dumlupınar University**, n. 011, p. 27-32, 2006.

TRAVLOS, I. *et al*. Allelopathic potential of velvet bean against rigid ryegrass. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 46, n. 1, p. 173-176, 2018.

VARGAS, L. A.; PASSOS, A. M. A.; KARAM, D. Allelopathic potential of cover crops in control of shrubby false buttonweed (*Spermacoce verticillata*). **Planta Daninha**, v. 36, e018173359, 2018.

VELINI, E. D. et al. Modo de ação de glyphosate. In: VELINI, E.D. et al. **Glyphosate**.1 ed. Botucatu: FEPAF, 2009. v. 1, p. 113-134.

VILLELA, F. A.; DONI FILHO, L. D.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6.000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 11/12, p. 1957-1968. 1991.

WIRIADINATA, H.; OHASHI, H.; ADEMA, F. Notes on Malesian Fabaceae (Leguminosae-Papilionoideae). 16. **The genus Mucuna. Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants**, v. 61, n. 2, p. 90-124, 2016.

WFO - **World Flora Online**. Disponível em: http://www.worldfloraonline.org. Acesso em: 03 ago. 2022.

ZASADA, I. A. *et al*. Velvetbean (*Mucuna pruriens*) extracts: impact on *Meloidogyne incognita* survival and on *Lycopersicon esculentum* and *Lactuca sativa* germination and growth. **Pest Management Science: Formerly Pesticide Science**, v. 62, n. 11, p. 1122-1127, 2006.

ZHOU, Y. H.; YU, J. Q. Allelochemicals and photosynthesis. In: In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. **Allelopathy: A physiological process with ecological implications**. Dordrecht, Netherlands: Springer. p. 127-139, 2006.

APÊNDICE A - Valor de F da análise conjunta para variáveis de crescimento e trocas gasosas das mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar para a duplicata experimental.

Avaliações	Períodos avaliados (Dias após o transplantio - DAT)						
	21	28	35	42	49	56	63
Crescimento de altura	$0,21^{ns}$	$0,44^{ns}$	$1,59^{ns}$	$2,20^{ns}$	$1,06^{ns}$	$1,00^{ns}$	$0,91^{ns}$
Crescimento do diâmetro	$0,05^{ns}$	$0,02^{ns}$	$0,09^{ns}$	$0,29^{ns}$	$0,31^{ns}$	$0,16^{ns}$	$0,98^{ns}$
Número de perfilhos	$0,05^{ns}$	$0,40^{ns}$	$0,20^{ns}$	$0,04^{ns}$	$1,14^{ns}$	$0,28^{ns}$	$0,38^{ns}$
Biomassa seca da parte aérea	-	-	-	-	-	-	$0,35^{ns}$
Biomassa seca da raiz	-	-	-	-	-	-	$1,94^{ns}$
Ci	$1,78^{ns}$	-	-	$0,21^{ns}$	-	-	$0,14^{ns}$
E	$8,20^{**}$	-	-	$0,52^{ns}$	-	-	$0,05^{ns}$
gs	$2,20^{ns}$	-	-	$1,07^{ns}$	-	-	$3,52^{**}$
A	$2,58^{ns}$	-	-	$2,23^{ns}$	-	-	$0,16^{ns}$
EUA	4,16*	-	-	$2,88^{ns}$	-	-	$0,11^{ns}$
A/*Ci*	$0,60^{ns}$	-	-	$1,18^{ns}$	-	-	$0,18^{ns}$

ns: não significativo; **: significativo a 5% de probabilidade; *Ci*: concentração interna de CO_2 na folha; *E*: taxa de transpiração; *gs*: condutância estomática; *A*: taxa de assimilação líquida de CO_2; *EUA*: uso eficiente da água; *A*/*Ci*: eficiência de carboxilação.

APÊNDICE B - Valor de F da análise conjunta para variáveis de crescimento e trocas gasosas de capim-braquiária submetidas a diferentes doses de L-DOPA para a duplicata experimental.

	Avaliações	Períodos avaliados (Dias após a aplicação - DAA)			
		3	7	14	21
Experimento 3.3.1	Comprimento da raiz (Experimento 1)	-	-	-	$0,54^{ns}$
	Comprimento da parte aérea (Experimento 1)	-	-	-	$0,19^{ns}$
	Biomassa seca da raiz (Experimento 1)	-	-	-	$0,25^{ns}$
	Biomassa seca da parte aérea (Experimento 1)	-	-	-	$0,77^{ns}$
	Comprimento da raiz (Experimento 2)	-	-	-	$0,26^{ns}$
	Comprimento da parte aérea (Experimento 2)	-	-	-	$0,63^{ns}$
	Biomassa seca da raiz (Experimento 2)	-	-	-	$0,73^{ns}$
	Biomassa seca da parte aérea (Experimento 2)	-	-	-	$1,11^{ns}$
Experimento 3.3.2	*Ci*	$2,13^{ns}$	$0,54^{ns}$	$0,44^{ns}$	$0,17^{ns}$
	E	$0,07^{ns}$	$2,93^{ns}$	$0,09^{ns}$	$1,73^{ns}$
	gs	$0,08^{ns}$	$1,41^{ns}$	$0,66^{ns}$	$0,87^{ns}$
	A	$0,58^{ns}$	$0,37^{ns}$	$0,61^{ns}$	$1,41^{ns}$
	EUA	$1,22^{ns}$	$2,15^{ns}$	$0,24^{ns}$	$0,10^{ns}$
	A/*Ci*	$0,17^{ns}$	$0,87^{ns}$	$0,17^{ns}$	$0,66^{ns}$
	Biomassa seca da parte aérea	-	-	-	$1,44^{ns}$

ns: não significativo. *Ci*: concentração interna de CO_2 na folha; *E*: taxa de transpiração; *gs*: condutância estomática; *A*: taxa de assimilação líquida de CO_2; *EUA*: uso eficiente da água; *A*/*Ci*: eficiência de carboxilação.