



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**RESISTÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO
HISTOLÓGICA DE ACESSOS DE *Pfaffia
glomerata* A *Meloidogyne incognita***

ANA CRISTINA MENESES MENDES GOMES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**BRASÍLIA/DF
ABRIL/2006**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

RESISTÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DE ACESSOS DE
Pfaffia glomerata** A **Meloidogyne incognita

ANA CRISTINA MENESES MENDES GOMES

ORIENTADOR: JEAN KLEBER DE ABREU MATTOS

CO-ORIENTADORA: REGINA MARIA DECHECHI GOMES CARNEIRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PUBLICAÇÃO: 221 / 2006

BRASÍLIA/DF
ABRIL/2006

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**RESISTÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DE ACESSOS DE
Pfaffia glomerata A *Meloidogyne incognita***

ANA CRISTINA MENESES MENDES GOMES

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO / SUBMETIDA À FACULDADE DE
AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA
DE CONCENTRAÇÃO DE DISCIPLINAS DE PRODUÇÃO VEGETAL.**

APROVADA POR:

**JEAN KLEBER DE ABREU MATTOS, PhD, Universidade de Brasília
(ORIENTADOR) CPF: E-mail:002.288.181-68 kleber@unb.br**

**REGINA MARIA DECHECHI GOMES CARNEIRO, PhD, Cenargen
(CO-ORIENTADORA) 438 348 099-34: E-mail:recar@cenargen.embrapa.br**

**JOSÉ RICARDO PEIXOTO, PhD, Universidade de Brasília
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 354 356 236-34 E-mail:peixoto@unb.br**

**MICHEL NICOLE, PhD, Unité “Résistance des Plantes”- Montpellier-
France
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: e-mail: nicole@mpl.ird.fr**

BRASÍLIA/DF, 19 de ABRIL DE 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ⁴

Gomes, Ana Cristina Meneses Mendes
Resistência e caracterização histológica de acessos de *Pfaffia glomerata*
A *Meloidogyne incognita* / Ana Cristina Meneses Mendes Gomes;
orientação de Jean Kleber de Abreu Mattos – Brasília, 2006.
58 p.: il.
Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de
Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2006.

1. resistência. 2. nematóide das galhas. 3. histologia 4. ginseng
brasileiro 5. hipersensibilidade. I. Mattos, J. II. PhD.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

GOMES, M. M. A. C. **Resistência e caracterização histológica de *Pfaffia glomerata* a *Meloidogyne incognita***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2006, 58 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Ana Cristina Meneses Mendes Gomes
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Resistência e caracterização
histológica de acessos de *Pfaffia glomerata* a *Meloidogyne incognita*.
GRAU: Mestre ANO: 2006

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Ana Cristina Meneses Mendes Gomes
CPF 462 387 941 00
SQN 212 Ed. San Pietro, ap. 212
70000 00 Brasília/DF - Brasil
3347 47 68 anagomes@cenargen.embrapa.br

**Sabia que seria difícil, mas, nunca
Pensei em desistir!
Tive sempre N.Sra de Fátima, força
E meu pai no coração!
Tantos momentos felizes passei!
Sentirei saudades!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!**

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a vida, a saúde, a fé, a força, a luz. Por me acompanhar em cada instante, me protegendo.

A meu pai João Pedro, a quem eu tanto amo, que esteve comigo a cada momento desta caminhada, a quem eu prometi esta tese. E a minha mãe Marcela tão amada, tão querida sem a qual eu nada seria. Esteve comigo também em cada momento, tirando os espinhos de meu caminho, cuidando de mim, dos meus filhos. Tenho tanto orgulho em ser vossa filha!

A meu Jomar, por tanto amor, cumplicidade, paciência, incentivo, por ter compartilhado cada dificuldade e me amparado. Enfim, pelo colo em todos os momentos difíceis, mas felizes.

A meus filhos, Tiago, Natália, Laura e Beatriz, por serem a razão da minha existência, a minha luz, a minha felicidade! Obrigada por serem meus filhos! Por terem me ajudado tanto! Amo muito todos vocês!!!!

Aos meus amados irmãos; Luisinho, Paulinho e Jorginho, meus queridos, que me ajudaram a cuidar dos filhotes, desde sempre. Se não fossem vocês, talvez não tivesse conseguido!

Aos meus avós Mena e Luís, por terem estado sempre ao meu lado, quando precisei. Pelo colo da minha avózinha, pelos conselhos, pelo amor, pelo aconchego. Amo vocês!

Aos meus queridos orientadores; Jean Kleber e Regina , por terem me aceitado como orientada, me ensinado com tanta paciência, me acompanhado, estado sempre a meu lado, pela vossa amizade ! É difícil encontrar pessoas e orientadores como vocês! Sentirei saudades! Devo a vocês esta tese!

À Regina, em especial, que esteve comigo a cada instante, sempre com muita atenção e carinho. Obrigada!

Ao Dr José Manuel Cabral, pelo apoio, por ter me concedido a oportunidade em estudar novamente, em aprender. Muito obrigada !

À Beatriz, minha prima, pelo incentivo, pelo apoio, pelos conselhos, pela amizade, mesmo de longe. Pela ajuda na produção das primeiras mudas.

Às queridas; Marisa, Débora e Tatiana, pela ajuda na produção das primeiras mudas.

Às minhas queridas Mariana e Cíntia pelo auxílio, pelo carinho!

À Luzia Lima, com quem aprendi a gostar da pesquisa, do laboratório. Minha saudosa orientadora da graduação. Obrigada pela amizade, pelo carinho!

Ao Dr Francisco Aragão, pelo apoio, pelo incentivo.

À Dra Diva Dusi e Dra Vera Carneiro, pelo incentivo, pelo apoio, pela amizade. Nunca vos esquecerei!

Ao Dr Guy Capdeville, meu orientador técnico, pelo apoio, pelos ensinamentos, pelas correções, pela paciência, pela amizade.

Ao Dr Roberto Vieira, pelo apoio, pelas plantas, pela amizade!

Ao Dr Dijalma Barbosa pelo apoio, pelas plantas, pelos ensinamentos, pelas correções, pela amizade!

À minha querida amiga Rosana Falcão, pela amizade, e principalmente, pela força no laboratório! Não te esquecerei!

À Elizângela pela amizade, pelo carinho!

À Karina Proite, pelo acompanhamento nos primeiros ensaios. Obrigada!

Aos meninos do laboratório de nematologia, Fabiane, Marcilene, Pedro, e Nathália, com quem compartilhei momentos felizes, angústias e vitórias. Sentirei saudades! Pedro obrigada pela ajuda nas contagens, nos cuidados com as plantas!

Ao Cláudio Melo e Francisco Schmidt, obrigada pelas fotografias!

À Célia Cordeiro pela estatística!

Aos professores da Faculdade de Agronomia, por terem me proporcionado o aprendizado e momentos felizes.

E por fim à querida amiga Maria de Fátima, que tanto me auxiliou, com quem compartilhei os últimos momentos deste trabalho, com quem dividi minhas apreensões. Muito obrigada pelos ensinamentos, correções, pelo carinho, pela amizade. Estarei sempre por perto!

Cada um de vocês é um pedacinho desta tese e um pedacinho de mim!

ÍNDICE

Resumo	
Abstrat	
1.Introdução.....	01
2.Objetivos.....	03
3.Revisão Bibliográfica.....	04
3.1 Importância da <i>Pfaffia glomerata</i>	04
3.2 Caracterização botânica e agronômica.....	06
3.3 Caracterização farmacológica.....	06
3.4 Aspectos sócio-econômicos.....	08
3.5 Aspectos agronômicos.....	08
3.6 Aspectos sociais dos coletores de <i>Pfaffia glomerata</i>	09
3.7 Classificação e caracterização biológica e fisiológica de <i>Meloidogyne</i> spp.....	10
3.7.1 Classificação.....	10
3.7.2 Ciclo de Vida.....	11
3.7.3 Sexualidade.....	13
3.8 Relação Hospedeiro / Parasita.....	14
3.9 Princípios básicos de resistência genética de plantas a <i>Meloidogyne</i> spp.....	16
3.9.1 Conceitos: resistência genética.....	17
3.9.2 Benefícios da resistência.....	20
3.9.3 Fontes de resistência.....	20
3.9.4 Resistência em plantas hospedeiras.....	21
4. Metodologia.....	26
4.1 Produção de mudas de <i>Pfaffia glomerata</i>	26
4.2 Identificação e produção do inóculo de <i>Meloidogyne incognita</i>	26
4.3 Multiplicação unidonal de <i>Pfaffia glomerata</i>	28
4.4 Reação dos diferentes acessos de <i>Pfaffia glomerata</i> a <i>Meloidogyne incognita</i>	28

4.5 Histopatologia comparada em plantas resistentes e suscetíveis a <i>Meloidogyne incognita</i>	29
5. Resultados.....	32
5.1 Resistência de acessos de <i>Pfaffia glomerata</i> a <i>Meloidogyne incognita</i>	33
5.2 Histopatologia comparada em plantas resistentes e Suscetíveis a <i>Meloidogyne incognita</i>	34
5.3 Observações histológicas das raízes infectadas suscetíveis, acesso Farmacotécnica.....	35
5.4 Observações histológicas das raízes infectadas resistentes, acesso UFV.....	36
6. Discussão.....	40
7. Conclusões.....	45
8. Referências Bibliográficas.....	46

RESUMO

Pfaffia glomerata, comumente denominada “ginseng brasileiro”, é uma planta da família Amaranthaceae que ocorre nas Américas e África, sendo que o Brasil é o mais importante centro de coleta dessa espécie para fins medicinais, alimentícios e cosméticos. Existem vários problemas fitossanitários que podem prejudicar essa planta, entre eles, os nematóides de galhas, *Meloidogyne* spp, que ocorrem causando sérios danos ao sistema radicular, onde estão armazenados os princípios ativos. Acessos de *P. glomerata* foram selecionados, quanto à resistência a *Meloidogyne incognita* raça 1, de coleções de plantas mantidas na Universidade de Brasília (UNB) e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen). Plântulas foram obtidas por mini estaquia a partir da planta mãe e inoculadas com 5000 ovos quando tinham aproximadamente 15 cm de comprimento. Noventa dias após a inoculação foram avaliados os sistemas radiculares quanto aos índices de galhas, de massas de ovos e os fatores de reprodução (FR). Os acessos São Luís (MA), UFV (MG), Cenargen 1 (DF), Pedra de Guaratiba (RJ), Itabaiana (SE) e Cenargen 2213-6 foram considerados altamente resistentes (FR<1); IAPAR (PR), Cenargen 2216-10 e Cenargen 2216-16, medianamente resistentes (FR= de 1,9 a 2,3); Cenargen 2217-10 e UFC (CE), suscetíveis (FR=10,0) e os demais acessos (Farmacotécnica, DF e Cenargen 2217-9) altamente suscetíveis (FR >80,0). A partir desses resultados, a utilização de acessos resistentes é uma medida bastante promissora para o controle de *M. incognita*, em cultivos comerciais de *P. glomerata*.

O presente estudo também comparou as respostas histológicas através de secções de radículas quanto à infestação por *M. incognita* de um acesso resistente (UFV) com um acesso suscetível (Farmacotécnica), com o objetivo de estudar o mecanismo da resistência. Primeiramente, a resistência do (UFV) esteve associada a um fator não identificado que limitou a penetração do nematóide e a uma resposta bioquímica que se manifestou após a penetração. Algumas células apresentaram características particulares como citoplasma colorido em azul escuro ou apresentando autofluorescência azul esbranquiçada (luz UV). Organelas alteradas foram observadas, indicando a presença de uma resposta de

hipersensibilidade (RH) nas células parasitadas do hospedeiro resistente e/ou entre elas. Células gigantes deformadas foram também observadas muitas vezes associadas a nematóides com autofluorescência azul esbranquiçada, indicando uma degeneração citoplasmática, devido à presença de compostos fenólicos no seu interior.

Palavras-chave: resistência, nematóide de galhas, histologia, ginseng brasileiro, hipersensibilidade.

ABSTRACT

Pfaffia glomerata, commonly denominated “Brazilian ginseng”, is a plant of Amaranthaceae family that occurs in Americas and Africa. Brazil is the most important center of assessment of this species for usage as medicinal, nutritious and cosmetics aims. Some disease problems can damage that plant, among them, the root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., cause serious gall symptoms on the roots, where the phyto-chemical compounds are stored. Accessions of *P. glomerata* were selected from a collection maintained in the University of Brasília (UNB) and Embrapa Genetic Resources and Biotechnology (Cenargen). Plants were obtained by cuttings from the plant mother and inoculated with 5.000 eggs when they were 15 cm of length approximately. Ninety days after the eggs inoculation the roots were evaluated, using galls index and the reproduction factor (RF). The accessions São Luís (MA), UFV (MG), Cenargen 1 (DF), Pedra de Guaratiba (RJ), Itabaiana (SE) and Cenargen 2213-6 were considered highly resistant (RF<1); IAPAR (PR), Cenargen 2216-10 and Cenargen 2216-16, moderately resistant (RF= from 1.9 to 2.3); Cenargen 2217-10 and UFC (CE), susceptible (FR=10) and the other accessions (Farmacotécnica, DF e Cenargen 2217-9) highly susceptible (RF >80). The current study also compared the histological response of section an accession resistant (UFV) and one susceptible (Farmacotécnica) to *M. incognita* infection with the aim to clarify the resistance mechanism. Resistance of ‘UFV’ was associated with unidentified factor that limited nematode penetration and with a post-penetration biochemical response. Several cells features including dark-stained or blue-white autofluorescence (UV

light) cytoplasm and altered organelle structure were observed in the resistant accession, indicating a hypersensitive response (HR) of the infested host cells. Features of giant cells were sometimes associated with nematodes with blue autofluorescence showing the degeneration of its cytoplasm and the presence of phenolic compounds.

Key words: resistance, root-knot nematodes, histology, Brazilian ginseng, hypersensitive.

INTRODUÇÃO

Pfaffia glomerata (Spreng) Pedersen, 1967, (Amaranthaceae) é uma espécie nativa de amplo uso popular, submetida a uma alta pressão antrópica devido ao extrativismo (Vieira *et al.*, 2002). O gênero possui cerca de 33 espécies distribuídas nas Américas Central e do Sul. No Brasil ocorrem 21 espécies em formações florestais e campestres, mais precisamente em orlas de matas, beira de rios, capoeiras úmidas e campos rupestres (Siqueira, 1988). Utilizada há séculos pelos índios brasileiros na cura e prevenção de doenças, *P. glomerata* teve suas propriedades medicinais comprovadas cientificamente no Japão apresentando propriedades terapêuticas no tratamento de diabetes, hemorróidas, além de mostrar efeito bioenergético, tônico, afrodisíaco e antidiarréico (Mashio, 1993).

O interesse pela *P. glomerata*, teve origem no uso popular de suas raízes, recebendo o nome comum de “Ginseng brasileiro”. Após a identificação de substâncias hormonais (Nishimoto *et al.*, 1987 e Shiobara *et al.*, 1992), com características de efeito adaptógeno, constatou-se uma grande demanda mundial pelas raízes desta planta, principalmente pelo Japão, onde a espécie foi bastante estudada sob o ponto de vista fitoquímico e farmacológico (Nishimoto *et al.*, 1987, Nishimoto 1990, Nishimoto, 1992 e Shiobara *et al.*, 1992). O Brasil tem sido o maior fornecedor mundial de raízes da planta. Aproximadamente 30 toneladas de raízes de *Pfaffia* spp. são oriundas de extrativismo, e exportadas mensalmente para o Japão. O procedimento extrativista intensificado a partir da validação científica de suas propriedades terapêuticas, tem reduzido a variabilidade das populações e conseqüentemente o fornecimento de matéria-

prima, além de causar prejuízos ao meio ambiente (Alcântara, 1994). Dessa forma, torna-se imprescindível o desenvolvimento de técnicas de cultivo como alternativa de produção agrícola, para reduzir o processo de extrativismo. Poucos estudos têm sido realizados nesta área, entretanto, em levantamentos fitossanitários realizados em coleções brasileiras, localizadas em diferentes regiões foram registradas a ocorrência de diversas pragas que limitaram a produção de *Pfaffia*. Entre essas pragas destacam-se os nematóides do gênero *Meloidogyne*, causando galhas e apodrecimento nas raízes (Araújo *et al.*, 1994). Recentemente, *M. javanica*, *M. incognita* e *Meloidogyne* sp. foram detectadas no Distrito Federal, causando danos a essas plantas (Mesquita *et al.*, 2005).

Com relação ao controle dos nematóides de galhas, uma das alternativas mais eficazes e menos dispendiosas é a utilização de plantas resistentes (Tihohod, 1993).

A resistência em plantas hospedeiras vem sendo priorizada em relação aos controles: químico, biológico, ou cultural, no contexto do manejo de pragas (Barker *et al.*, 1994). Roberts (2002) cita as muitas vantagens e benefícios que podem ser obtidos com a utilização de plantas resistentes a nematóides que ao serem cultivadas em áreas infestadas, inviabilizam as doenças, restaurando a produtividade das plantas. Ao reduzirem a reprodução estão suprimindo a densidade do parasito no solo, a níveis não danosos às culturas subseqüentes.

Tendo em vista que os nematóides parasitam as raízes de *P. glomerata*, que são a sede da extração de substâncias utilizadas na produção de fármacos, há necessidade de serem avaliados acessos dessa planta quanto à resistência ao nematóide de galhas, de forma a embasar uma estratégia de produção sustentável de *P. glomerata*.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar 13 acessos de *P.glomerata* das coleções de Plantas Medicinais da UnB e Cenargen quanto à resistência ao nematóide de galhas, *Meloidogyne incognita* raça 1;

Caracterizar histologicamente a resistência de *Pfaffia glomerata* a *M. incognita*, através de estudo comparativo entre acessos resistente e suscetível.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A Importância da *Pfaffia glomerata* caracterização botânica, agrônômica e farmacológica

A retomada do incentivo oficial do uso de plantas medicinais teve como marco a reunião em 1977 pela Organização Mundial de Saúde, que resultou na Declaração de Chiang Mai “Salvem Plantas que salvam vidas”. Isto não quer dizer, que as plantas medicinais não eram utilizadas antes disso, muito pelo contrário, as pessoas menos favorecidas e com maior dificuldade de acesso à saúde não tinham outra saída, senão as ervas caseiras. Cerca de 80% da população mundial depende da medicina tradicional para tratamento de suas doenças (Farnsworth, 1985). Após a revolução dos medicamentos sintéticos, a indústria farmacêutica, vem se voltando para o Reino Vegetal, em busca de saídas para a cura de várias doenças, até então, incuráveis, como o câncer e a AIDS (Corrêa Júnior, 2002).

Os bons resultados das pesquisas comprovando cientificamente o efeito terapêutico das plantas medicinais já utilizadas pela população são a base científica para o uso de nossos recursos naturais e de espécies exóticas, podendo ser uma forma de enfrentar os elevados preços dos medicamentos e a dependência externa nesta área, oferecendo mais uma alternativa terapêutica (Corrêa Júnior, 2003).

O Brasil é um país com enorme biodiversidade abrigando 10% de 1,4 milhões de organismos catalogados, com destaque para os vegetais superiores que somam 55.000 (EMBRAPA, 1996, *apud*, Corrêa Júnior, 2003). Segundo Corrêa Júnior (2003) dentre as plantas nativas brasileiras de maior uso popular ou industrial estão a ipecacuanha (*Cephaelis ipecacuanha*), jaborandi

(*Pilocarpus jaborandi*), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*), e dentre as fáfias, a (*Pfaffia glomerata*), entre outras, que já possuem inclusive patentes de medicamentos no exterior. Estas espécies têm sofrido grande erosão genética, correndo o risco de extinção, causado pela própria população que utiliza a flora de maneira extrativa. O fornecimento da matéria-prima, de plantas medicinais está em risco, porque além do extrativismo, o local onde elas ocorrem naturalmente, está sendo cada vez mais destruído por pressões, como, as exercidas pelo desmatamento, agricultura, urbanização, etc, não existindo áreas cultivadas suficientes para atender a toda essa demanda (Corrêa Júnior, 2003).

Utilizada há séculos pelos índios brasileiros na prevenção e cura de doenças, a fáfia só teve suas propriedades comprovadas cientificamente, depois de levada ao Japão e submetida à análise pelo laboratório “Rhooto Pharmaceutical Co Ltda” (Corrêa Júnior, 2003).

Estudos recentes mostraram que a raiz da planta atua na regeneração celular, purificação do sangue, inibição do crescimento de células cancerígenas, regularização das funções hormonais e sexuais e como bioenergético (Nishimoto *et al.*, 1990, Shiobara *et al.*,1992).

As raízes do gênero fáfia são utilizadas na medicina popular, no Brasil, especialmente, como tônicas, afrodisíacas e antidiabéticas. O uso dessas espécies conhecidas popularmente como “ginseng brasileiro”, têm despertado a atenção de japoneses e europeus, que vêm importando quantidades cada vez maiores (Corrêa Júnior, 2003). Estima-se que nos últimos sete anos, o consumo tenha aumentado entre 15 e 17% ao ano (Corrêa Júnior, 2003).

3.2 Caracterização Botânica e Agronômica

Estabelecido por Martius em 1826, o gênero *Pfaffia* Mart tem como espécie tipo *Pfaffia glabrata*. A etimologia do gênero é em homenagem ao físico e químico alemão Pfaff (1774-1852).

São conhecidas por “ginseng brasileiro”, principalmente a *Pfaffia glomerata*, *Pfaffia paniculata* Kuntze, e a *Pfaffia iresinoides* (H.B.K.) Sprengel, já com estudos fitoquímicos e farmacológicos bem avançados.

Pfaffia glomerata, vegeta naturalmente às margens e ilhas do Rio Paraná, entre os Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, onde se encontra em extinção, devido ao seu extrativismo. Erva perene, de porte arbustivo, e de até 2,5 m de altura, é também conhecida pelos nomes de: Ginseng brasileiro, Corango, Corrente, Batata do Mato ou Paratudo (Rosa, 1997, Corrêa Júnior, 2003).

3.3 Caracterização Farmacológica

Da *Pfaffia glomerata* foram isolados substâncias como: ácido glomérico, ácido pfamérico e rubrosterona, (Shiobara *et al.*, 1992; Nishimoto *et al.*, 1990), β -ecdisona, ecdisterona, β -D glucopiranosil oleato (Nishimoto *et al.*, 1990). Os teores de ecdisona em raízes secas de *Pfaffia glomerata*, determinados em diversos trabalhos variam entre 0,64 e 0,76% (Montanari *et al.*, 1997). Além disso, há compostos associando extratos de plantas do gênero *Pfaffia*, com flavonóides, com o fim de tratar e prevenir doenças, exercendo atividade imunoestimulante, antialérgica, psicotrópica e/ ou tônica. Outros produtos contendo extratos de espécies do gênero *Pfaffia* foram patenteados como: compostos antialérgicos por Masaki *et al.* (2002), Patente JP 2002308795,

preparado anti-rugas, por Katsumi & Katsumi (2002), Patente JP 2002173414 e conservante de geléia real por Sugiyama em 1990, Patente JP 21145161.

Freitas (2002) demonstrou ação protetora gástrica e anti-secretora ácida, utilizando extrato hidroalcoólico bruto de *Pfaffia glomerata*. O extrato aquoso bruto, além das mesmas ações do hidroalcoólico, apresentou ação cicatrizante em úlcera gástrica pré-formada.

Marques (1998) em teste com ratos, concluiu que o liofilizado de raízes de *P. glomerata* tem efeito de melhoria na aprendizagem de ratos idosos, tratados cronicamente, e possui toxicidade em níveis muito baixos. Em humanos houve melhora na memória imediata e remota, porém, houve prejuízo na atividade psicomotora.

Meybeck *et al.* (1994), relatou que os ecdisteróides se compõe de um grupo de 2, 3,14 – trihidroxi - Δ -6-7- cetosteróides, representados pelos compostos extraídos de *P. iresinoides* e *P. glomerata*. A ecdisterona ou β -ecdisona é o esteróide mais importante, empregado nas formulações cosméticas, atuando no fortalecimento da barreira hídrica da pele, impedindo a perda excessiva de água da epiderme. A comprovação da eficácia da *P. glomerata* como planta medicinal aumentou a sua procura e extração de raízes, principalmente às margens do Rio Paraná. A forma de exploração atual dessas plantas degrada o meio ambiente, exaurindo os recursos naturais. Esta degradação poderia ser minimizada pelo processo de domesticação e cultivo dessas espécies, tornando-as, disponíveis para uma porção maior da população (Corrêa Júnior, 2003).

Essa atividade fez com que várias entidades (públicas e privadas), coletores nacionais e internacionais, propusessem o cultivo sistemático da

espécie, visando abastecer o mercado nacional e internacional, dentro das melhores técnicas agronômicas. Assim, os extratores não precisarão recorrer à sua destruição para sobreviver, pelo contrário, as cultivarão sustentavelmente (Corrêa Júnior, 2003).

3.4 Aspectos sócio-econômicos

Devido ao interesse que as espécies de *Pfaffia* têm, tanto no mercado nacional, quanto internacional, elas foram incluídas na relação de espécies prioritárias para estudos durante a 1ª Reunião Técnica sobre Estratégias para Conservação e Manejo de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas, realizada pela EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Ibama e CNPq, em setembro de 2001 (Vieira *et al.*, 2002). Estima-se que em 2002 foram extraídas em torno de 720 toneladas da raiz resultando cerca de 190 toneladas beneficiadas (em pó), destinadas ao mercado interno e de exportação (Departamento de Operações de Comércio Exterior (DECEX), citado por Corrêa Júnior, 2003).

Segundo este mesmo órgão em 2001, cerca de 12% de fáfia foram exportados. Verificou-se também que espécies de *Pfaffia* têm sido exportadas como ração, cuja alíquota por ser mais baixa, omite a condição de planta medicinal.

3.5 Aspectos Agronômicos

Pfaffia glomerata, produz sementes férteis, com poder germinativo entre 50 – 77% (Magalhães *et al.*, 1994). Também se propaga vegetativamente, por estacas ou cultura de tecidos (Alves *et al.*, 1996). O produto final são as raízes.

A propagação por sementes tem a vantagem de desenvolver raízes pivotantes e mais grossas, quando comparadas com as plantas propagadas por estacas, onde o sistema radicular é fasciculado. A aceitação comercial é maior para as raízes grossas, mas, a propagação por sementes promove populações com certa variabilidade genética. Mesmo assim, pode-se ter relativa uniformidade, coletando-se sementes de uma única planta ou de plantas semelhantes (populações meio-irmãs). Montanary Jr (1997) vem explorando a variabilidade genética em *P. glomerata*, selecionando genótipos em função dos rendimentos de biomassa e em ecdisterona, relação parte aérea:raízes, e correlacionando o teor de princípio ativo com a coloração das raízes, e esse último com marcador genético (Magalhães, 1998).

3.6 Aspectos Sociais dos Coletores de *Pfaffia glomerata*

No noroeste do Paraná, aproximadamente 800 pequenos agricultores, atuais assentados, participam da coleta de fáfia (Corrêa Júnior, 2003), das quais 25%, mulheres. Cada homem, colhe em média 84 kg de raízes por dia de trabalho. A coleta (extrativista) é manual e concentra-se nos meses de maio a julho, quando as áreas de coleta não estão inundadas e não há outras atividades agrícolas para ocupação da mão-de-obra. Segundo os agricultores, as raízes amarelas, apresentam maior peso, nesta época (Corrêa Júnior, 2003).

No processo de coleta os agricultores queimam os campos, com o objetivo de “limpar” a área, livrando-lhes dos animais peçonhentos, e por ser a *P. glomerata*, uma das primeiras plantas a rebrotar, eles vêm utilizando este “método” o que lhes facilita a localização das plantas em meio às demais.

Preferem então, coletar nas ilhas do rio, pois as raízes são de melhor qualidade e maior peso, devido à maior fertilidade do solo (Corrêa Júnior, 2003).

As raízes são desenterradas com auxílio de enxadas e ensacadas em sacos de polietileno, fornecidos pelos compradores. Esses vão buscar o produto aos locais de coleta, ou nas casas dos coletores. As primeiras etapas do processamento são: lavagem, corte e moagem das raízes, até transformá-las em pasta, logo após são submetidas a uma pré-secagem ao sol, sobre uma lona plástica. Depois de seco e moído, o pó é vendido pelos intermediários aos atacadistas e/ ou exportadores (Corrêa Júnior, 2003)

O preço do quilo da raiz seca pago aos coletores, varia de US\$0,10 a US\$0,13. Com isto, a renda média por família obtida com a coleta de fáfia seria de US\$ 2.220,00 ao ano, sendo que a coleta representa 70% da renda dessas famílias. Depois de beneficiado, o produto é vendido a US\$ 5,00/kg para atacadistas e indústrias. Quando exportado chega a US\$ 15,00 / kg (Corrêa Júnior, 2003).

3.7 Classificação e caracterização biológica e fisiológica de *Meloidogyne* spp.

3.7.1 Classificação

As espécies do gênero *Meloidogyne* (Goeldi, 1887) constituem uma pequena parte do Filo Nemata que compreende os parasitas do homem, dos animais e parasitas de plantas e espécies de vida livre no solo, em água doce e no mar (Maggenti, 1981). O gênero *Meloidogyne* faz parte da classe Secernentea, da ordem Tylenchida, da superfamília Tylenchoidea, da família Heteroderidae,

subfamília Meloidogyninae (Baldwin, 1992). Nematóides de raiz são os parasitas economicamente mais importantes, responsáveis por atacar quase todas as culturas em fase de crescimento (Sasser & Freckman, 1987). Sua distribuição no planeta é ampla, interagindo com outros patógenos de plantas, formando complexos de doenças, afetando o suprimento de alimentos (Sasser, 1980). Quatro espécies *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria* e *Meloidogyne hapla*, acometem 95% de todas as infestações de nematóide em raízes na agricultura, sendo que o *Meloidogyne incognita* é economicamente o mais importante (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

3.7.2 Ciclo de Vida

Os nematóides de galhas possuem como característica o dimorfismo sexual. As diferenças gerais na forma do corpo entre machos e fêmeas, tais como fêmeas arredondadas e machos vermiformes, são estabelecidas durante o desenvolvimento pós-embrionário do nematóide (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). O desenvolvimento embrionário resulta no juvenil de primeiro estágio que sofre uma ecdise ainda no ovo, dando origem ao juvenil de segundo estágio (J2). Nesse estágio é móvel, vermiforme, infectivo e migra através do solo atraído por substâncias que emanam das plantas, penetrando nas raízes da hospedeira suscetível. Os J2s movem-se através do tecido da planta perfurando-a, com o estilete, e migram até a zona de alongação da raiz, onde estabelecem o seu sítio de alimentação no parênquima vascular, firmando um complexo relacionamento com a planta (Taylor & Sasser, 1983). O J2 torna-se sedentário e alimenta-se de células especiais chamadas células nutrices (células gigantes), sofrem então, mudanças morfológicas, passando por três

ecdises para se transformarem em juvenis de terceiro e quarto estádios e, finalmente, em adultos. Logo após a última ecdise, a fêmea adulta recomeça a se alimentar, permanecendo ali para o restante de sua vida (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Durante esse desenvolvimento pós-embrionário, o sistema reprodutivo desenvolve-se e crescem as gônadas funcionais. A mudança de forma nos macho (piriforme para adulto vermiforme) ocorre durante o quarto estágio juvenil (J4). Nesse período, o J4 sofre uma metamorfose na qual o corpo se alonga, assumindo o macho, uma forma vermiforme (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

O macho de quarto estágio está envolvido pelas cutículas do segundo e terceiro estádios, e após a última ecdise, emerge inteiramente desenvolvido (Taylor & Sasser, 1983). Os machos adultos não se alimentam, saem da raiz e movem-se livremente no solo. Dependendo do tipo e modo de reprodução das espécies, se anfigimixia ou partenogênese, o macho pode procurar por uma fêmea e acasalar-se, permanecendo no solo até à morte (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

A duração do ciclo de vida do nematóide de galhas é bastante afetada pela temperatura. As fêmeas produzem ovos por três meses. Depois cessam a produção, podendo viver um pouco mais. Os machos vivem semanas e os J2s podem viver de poucos dias a meses (Taylor & Sasser, 1983). No caso de *M. incognita* parasitando o tomateiro, à temperatura de aproximadamente 29° C, as primeiras fêmeas adultas aparecem entre o 13° e 15° dias após a penetração; os primeiros ovos são encontrados do 19° ao 21° dias. O ciclo de vida das fêmeas, produzindo ovos, pode-se estender de 2 a 3 meses, e o dos machos pode ser bem mais curto (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

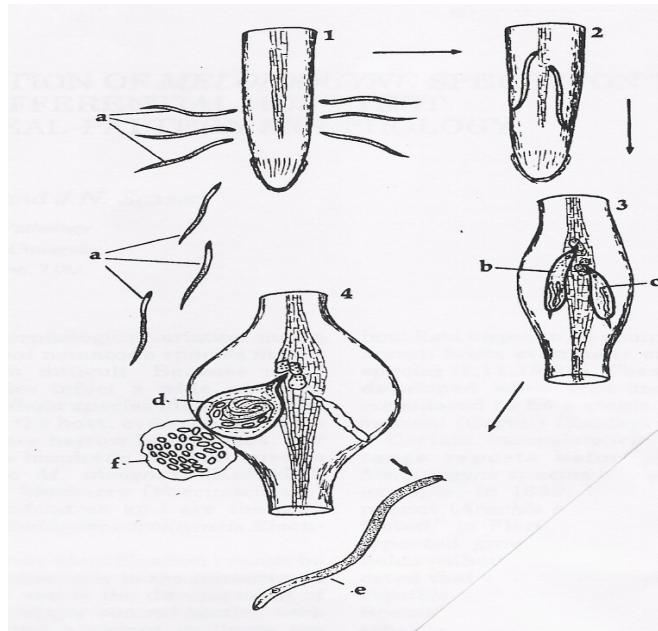


Figura 1: Esquema do Ciclo de Vida dos nematóides de galhas *Meloidogyne* spp. (De Guiran, 1983) 1. Atracção e penetração na raiz de juvenis de segundo estágio (J2); 2. J2 à procura de sítios de alimentação; 3. Formação de células nutrizas (células gigantes envolvidas por galha característica); 4. Transformação de J2 em J3 ou J4 (b) e em macho (c); Fêmea adulta (d) produzindo ovos. Macho adulto (e) em liberdade. A fêmea dos nematóides produzindo ovos no exterior da raiz numa matriz gelatinosa (f), de onde eclodirão os futuros J2 (a). Macho recém eclodido (e).

3.7.3 Sexualidade

Os nematóides de galhas são conhecidos por não exibirem uma razão sexual balanceada. Espécies com fertilização cruzada normalmente têm a razão sexual de um macho para uma fêmea. Aparentemente o desenvolvimento sexual em cada espécie é geneticamente controlado. Espécies que se reproduzem por partenogênese facultativa ou obrigatória possuem taxas sexuais variáveis. Por exemplo, em *M. hapla* e *M. incognita* os machos podem ser raros ou ausentes sob certas condições ambientais e abundantes em outras condições (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Acredita-se que essa diferenciação sexual seja controlada por fatores ambientais, alta taxa da população de juvenis, hospedeiros não favoráveis e altas temperaturas. Em

condições ambientais favoráveis, os juvenis seguem um desenvolvimento normal tornando-se fêmeas adultas com dois ovários. Sob condições desfavoráveis os juvenis, que se tornariam fêmeas, sofrem reversão sexual e desenvolvem-se para macho. Dependendo do estágio de desenvolvimento em que ocorreu a reversão sexual, os machos sexo-reversos podem ter duas gônadas de tamanhos variáveis que correspondem aos dois ovários das fêmeas. Se a reversão sexual ocorreu cedo nos juvenis de segundo estágio, o desenvolvimento resulta em machos sexo-reversos com apenas um testículo (Papadopoulou & Triantaphyllou, 1982). Isso também pode resultar no desenvolvimento de indivíduos intersexuais, macho ou fêmea, com algumas características sexuais do sexo oposto, conforme foi observado por Carneiro *et al.*, (1998) em populações brasileiras de *M. javanica*. Reversão sexual em período intermediário resulta em machos sexo-reversos com um testículo bem desenvolvido e outro rudimentar de tamanho variável. (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

3.8 Relação Hospedeiro / Parasita

Os nematóides de galhas possuem estruturas especializadas: estiletos e glândulas esofageanas secretoras, que são essenciais ao parasitismo. O estilete é uma estrutura protuberante, utilizada como perfurador da parede celular e como injetor do conteúdo produzido pelas glândulas esofageanas (Hussey, 1985). Esse mesmo autor (1989), conclui que ao inserirem o estilete nas células, os nematóides secretam proteínas (enzimas) e carboidratos no seu interior.

Endoparasitas sedentários obrigatórios possuem um envolvimento complexo com seus hospedeiros (Hussey, 1985). Os J2s infectivos são atraídos

através de anfídios (órgãos químicos) e penetram nas raízes das plantas, concentrando-se nas regiões do meristema apical, migrando até a zona de alongação, através da epiderme. Migram intercelularmente, separando as células na lamela média do tecido cortical, rompendo paredes celulares com auxílio do estilete e causando necroses celulares (Golinowski *et al.*,1996). Este processo envolve uma ação mecânica e uma ação bioquímica, com a secreção de enzimas como a celulase (Bird *et al.*,1974) e a proteínase (Koritsa & Atkinson,1994) que atravessam o estilete e contêm 'gatilhos bioquímicos' para iniciar a formação de células gigantes. Depois de penetrar a endoderme, os nematóides perfuram a parede da célula, dando início à penetração do procâmbio e do xilema primário, onde injetam secreções. Uma ativação celular do metabolismo se inicia. Cada célula nutriz aumenta muito em tamanho sofrendo endomitoses sem citocineses. Incitando o desenvolvimento das células gigantes, onde estabelecem um sítio de alimentação no parênquima vascular (Taylor & Sasser, 1983). As células gigantes tornam-se hipertrofiadas e multinucleadas, provavelmente como resultado da introdução de secreções produzidas pela glândula esôfageana dorsal do J2 (Hussey, 1985; Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Os nematóides obtêm sua alimentação dessas células nutritivas especializadas e sem elas não podem evoluir para a fase adulta. Os machos, aparentemente, não se alimentam e saem das raízes, as fêmeas continuam se alimentando das mesmas células gigantes durante toda a sua vida. Os J2s desenvolvem-se em fêmeas globosas e iniciam a postura entre 3 e 6 semanas após a infecção, dependendo da espécie, das condições ambientais e da planta. Os ovos são colocados na superfície da raiz, protegidos por uma matriz gelatinosa (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

As células gigantes, ativas metabolicamente, servem como permanentes fontes de nutrientes para o endoparasita (Huang, 1985), transferem os metabólitos para os nematóides que atuam como um escoadouro (Endo, 1979). A infecção por *Meloidogyne* afeta a absorção e o deslocamento de nutrientes na planta. Os produtos da fotossíntese são mobilizados para as células gigantes nas raízes e, como resultado, não ocorre o crescimento da planta, podendo a produção da planta ser altamente afetada (Hussey, 1985). Outros sintomas da parte aérea de plantas infectadas incluem clorose da folhagem e o murchamento temporário durante o período de falta de água (Hussey, 1985; Eisenback & Triantaphyllou, 1991). O mecanismo de formação das células gigantes tem sido muito estudado (Endo, 1979; Eisenback & Triantaphyllou, 1991). O tecido da raiz que envolve o nematóide e as células gigantes sofrem hiperplasia e hipertrofia resultando em galhas características nas raízes, distorcendo as características estruturais da raiz. As galhas normalmente aparecem 1-2 dias após a penetração dos J2s. Dependendo da espécie da planta parasitada e do número de nematóides presentes em seu tecido, o desenvolvimento da planta sofre alterações. As galhas induzidas pela maioria das espécies de *Meloidogyne* são similares em sua morfologia (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

3.9 Princípios básicos da resistência genética de plantas a *Meloidogyne* spp

O primeiro autor a descrever a resistência de plantas a nematóides foi Webber & Orton (1902), em raízes de caupi, variedade Iron, baseado na redução de galhas em talhões de lavouras. Barrons (1939) foi um dos primeiros

a estudar os mecanismos de resistência a nematóides em raízes de cafeeiros, distinguindo resistência de tolerância, observando que a resistência não é a inibição da penetração na raiz. Especulou ainda, que a secreção de substâncias químicas, inibidores, impediriam a ação de substâncias excretadas na saliva dos nematóides que induziriam a formação de células gigantes.

3.9.1 Conceitos: resistência genética

A resistência de plantas a patógenos é definida como a habilidade da planta em inibir ou impedir a reprodução de patógenos (Valette *et al.*, 1998; Trudgill, 1991). De uma maneira geral, dois tipos de resistência podem ser observados: pré-infectiva e pós-infectiva. A resistência pré-infectiva é uma resistência passiva, que ocorre antes da penetração do nematóide na superfície das raízes, e está associada à produção de exsudatos radiculares que repelem o J2 ou são tóxicos a ele (Rhode, 1972, Roberts *et al.*, 1998). A resistência pós-infeccional é a mais comum e se manifesta após a penetração dos tecidos da planta. É uma resistência ativa, determinada pela reação entre parasita e hospedeiro (Wallace, 1973). A definição de alguns termos como imunidade, resistência, tolerância, suscetibilidade é muito importante para o entendimento e aplicação pelos nematologistas. Estes termos foram definidos por: Roberts, 1982; Cook & Evans, 1987; Cook, 1991; Trudgill, 1991. Muitas plantas são imunes ou não hospedeiras a muitos nematóides. Elas não permitem o ataque, ou seja, bloqueiam a penetração inicial na raiz, desse modo previnem o desenvolvimento e a reprodução do parasita, não ocorrendo danos à raiz. A resistência pode ser de baixa a moderada (parcial ou intermediária) ou ser alta. A resistência completa da planta não permite que a reprodução ocorra ou

permite uma reprodução muito reduzida. A parcial ou moderada, permite uma reprodução baixa do patógeno.

A suscetibilidade é usada como o oposto à resistência. Plantas susceptíveis permitem o desenvolvimento normal do nematóide com uma alta reprodução (Roberts, 2002). A tolerância se refere à habilidade das plantas permitirem a invasão e reprodução do nematóide, mas não apresentarem sintomas ou danos significativos (Fassuliotis, 1979). Segundo Roberts (2002), a tolerância é o oposto à intolerância, que é utilizada para definir as plantas que quando infectadas crescem menos, morrem ou ainda reduzem drasticamente a produtividade. Desta forma, uma planta suscetível, pode ser intolerante ou tolerante ao nematóide. Igualmente, o hospedeiro resistente pode ser tolerante ou intolerante (Roberts, 2002).

A resistência é relatada como um modo de herança que pode ser expressa por um único gene (monogênica), por alguns genes (oligogênica), ou por muitos genes (poligênica). Pode ser definida também de acordo com a soma de efeitos fenotípicos expressos por genes importantes (maiores efeitos) ou por genes menos importantes (pequenos efeitos) (Roberts, 2002). Outras descrições de resistência apresentadas por Vanderplank's (1978) classificam a resistência em vertical (qualitativa, é específica a uma determinada raça ou biótipo de patógenos) e resistência horizontal (quantitativa, é efetiva contra todas as variantes do patógeno). A resistência vertical é usualmente controlada por um ou alguns genes. É uma interação do tipo gene a gene, como comumente ocorre na interação patógeno-planta (Flor, 1971). Já, a horizontal, é usualmente poligênica recessiva, genes menos importantes são responsáveis por ela, possuem sempre efeitos aditivos que conferem um nível quantitativo de

resistência. Em geral, a resistência quantitativa tende a ser mais durável ou menos frágil à pressão exercida pela população de nematóides.

A virulência é definida como a habilidade que o nematóide possui em se reproduzir na planta hospedeira, que possui um ou mais genes de resistência. Nematóides virulentos são capazes de se reproduzir em plantas resistentes, e nematóides não virulentos não são capazes de se reproduzir na presença de genes específicos. Outro aspecto importante da virulência é que numa população de nematóides, existem indivíduos virulentos e outros não virulentos. A chance de haver somente indivíduos virulentos ou não virulentos numa população é rara. A frequência de indivíduos virulentos irá determinar o potencial para selecionar a virulência na presença de plantas hospedeiras resistentes. Em patologia de plantas, os genes que codificam esta característica são chamados de genes de avirulência ou “Avr genes” (Roberts, 2002)

Diferentes termos são utilizados para caracterizar os tipos ou as formas da variação fisiológica dos nematóides, baseados na resposta do hospedeiro. Termos usados para caracterizar essas diferenças, algumas vezes se confundem, devido ao seu uso indiscriminado para os diferentes grupos de nematóides. Por exemplo, quando se trata de raça ou raça-hospedeira, que são separadas por diferentes reações nos hospedeiros de diferentes espécies de plantas, enquanto que patótipos são diferenciados por genes de resistência em diferentes cultivares (Roberts, 2002).

Trianhaphyllou (1987) sugeriu o termo biótipo como uma unidade biológica, consistindo em um grupo genético fechado, que relaciona indivíduos que apresentam características marcantes comuns, em relação à habilidade do parasita em atacar diferentes hospedeiros. Populações de campo podem

consistir em indivíduos com diferentes biótipos e combinações de biótipos de populações do campo designadas como raças. Populações de campo podem representar uma raça com: um, dois, três ou mais biótipos e com diferentes proporções. Uma população pode ser formada por mais de um biótipo, dependendo de sua carga genética para a avirulência, em relação à constituição genética dos diferentes hospedeiros utilizados para classificar os biótipos (Triantaphyllou,1987).

3.9.2 Benefícios da Resistência

A maior parte dos programas visando obtenção de cultivares e porta-enxertos resistentes têm utilizado em geral apenas um gene de resistência principal. Geralmente, este tipo de resistência é facilmente identificada e para incorporá-la, recorre-se a programas de retrocruzamento ou pedigree, utilizando técnicas convencionais de cruzamento. Um bom exemplo desse melhoramento foi a introdução do gen Mi proveniente do tomateiro selvagem, (*Lycopersicum peruvianum* L. Mill) em cultivares comerciais de tomateiro. Esse gene confere resistência a *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica* (Roberts, 2002). Através de décadas, híbridos resistentes de tomateiro foram amplamente comercializados e a resistência condicionada pelo gene Mi, foi um ótimo modelo para se entender a resistência genética a nematóides (Williamson,1998).

3.9.3 Fontes de resistência

Freqüentemente, fontes de resistência naturais são difíceis de serem encontradas (Fassuliotis, 1979). Fassuliotis *et al.* (1970), encontraram apenas dois acessos resistentes em 1100 plantas (cultivares e linhagens) introduzidas

de feijão, *Phaseolus vulgaris* L., com suficiente resistência para ser incluído nos programas de melhoramento genético. Muitos outros exemplos semelhantes podem ser citados. A resistência a nematóides é disponível em algumas espécies vegetais, mas novas fontes de resistência são necessárias (Roberts, 2002).

Quando a resistência não pode ser encontrada em plantas cultivadas, a atenção deve ser dada para espécies ou gêneros selvagens. Algumas espécies selvagens têm sido incluídas nos programas de resistência genética. Shepherd (1974a, 1974b) desenvolveu um cultivar de algodão altamente resistente, resultante do cruzamento entre *Gossypium barbadense* L. e *G. hirsutum* L. Outro exemplo importante foi o caso do tomateiro acima citado. Nesse caso, devido à incompatibilidade sexual entre a espécie selvagem e *L. esculentum* Mill, culturas embriogênicas foram usadas para desenvolver a planta híbrida (Smith, 1944) e repetidos retrocruzamentos com cultivares comerciais de tomate foram utilizados, com o desejo de alcançar qualidade e produtividade para a cultura (Roberts, 2002).

3.9.4 Resistência em Plantas Hospedeiras

Plantas são definidas como resistentes a nematóides quando reduzem os níveis de reprodução desse patógeno (Trudgill, 1991). Genes de resistência a nematóides estão presentes em algumas espécies de plantas e são importantes componentes nos programas de melhoramento de várias culturas. A resistência pode ser ampla ou múltipla, efetiva somente para algumas espécies de nematóides, ou estreita, quando controla biótipos específicos das espécies

(Trudgill,1991,Kreike *et al.*,1993, Faghihi *et al.*, 1995, Wang and Goldman, 1996).

Vários genes de resistência semidominantes ou dominantes vêm sendo identificados e mapeados nos cromossomos. A resistência pode ser poligênica ou recessiva (Trudgill, 1991, Kreike *et al.*, 1993, Faghihi *et al.*, 1995, Wang & Goldman, 1996). Às vezes a resistência poligênica é exercida por genes mais importantes, os quais são geneticamente dominantes, ou por genes menos importantes responsáveis por modelar a resposta (Kreike *et al.*,1994, Webb *et al.*,1995). Existem genes de resistência relacionados com a formação de necroses ou com a reação de hipersensibilidade (RH). Essa resistência é considerada intermediária e é caracterizada pela localização de necroses em células do hospedeiro próximas ao nematóide (Dropkin, 1969). A resposta de hipersensibilidade é facilmente vista, por ocorrer em aproximadamente 12h após a penetração dos J2s, dependendo da espécie vegetal. Esse tempo sugere o início da formação das células gigantes pelo nematóide (Paulson & Webster, 1972). Por exemplo, o gene H1 está relacionado com a resistência da batata a *Globodera rostochiensis*, e é caracterizado pela necrose no tecido ao redor da área ocupada pelo nematóide (Rice *et al.*,1987). A morte celular é diretamente responsável pela resistência. Adicionalmente, mudanças moleculares ocorrem rapidamente afetando a infecção em plantas resistentes. Por exemplo, o nível de atividade de enzimas, como fenilalanina, amonialiase e peroxidase aniônica, induzem facilmente a resposta de resistência no hospedeiro (Willianson & Hussey, 1996).

As respostas de incompatibilidade que levam à RH estão freqüentemente associadas ao aparecimento de áreas contendo células mortas nos locais por

onde o patógeno passou. Classicamente, essa resposta é definida como a morte de células do hospedeiro, quando, em contato com o patógeno por poucas horas, programam sua morte, para assim, defenderem a planta (Agrios, 1998). Mas, a RH pode ser fenotípicamente diversa. Pode expressar-se em uma única célula ou em áreas difusas de necrose, acompanhando o limite da colonização do patógeno (Holub *et al.*,1994). A RH um tem importância no mecanismo de resistência à doença (Heath, 1980) em interação com parasitas biotróficos impedindo a formação de células gigantes e produzindo células mortas que privam o acesso do patógeno à alimentação. Em interações envolvendo patógenos semibiotróficos e necrotróficos, o desenvolvimento da RH é menos clara, porque estes podem obter nutrientes de células de plantas mortas (Osbourn,1996).

A RH pode inibir ou impedir do desenvolvimento do patógeno, mas, pode conseqüentemente ativar outras respostas de defesa (Kosack-Hammond & Jones, 1996). A ausência ou presença de RH, não determina que um outro mecanismo qualitativo de resistência exista, isto porque todos os genes de resistência iniciam respostas que possam resultar em RH, mas, algumas respostas podem prevenir doenças tão eficientemente que a morte celular não é ativada (Kosack-Hammond & Jones, 1996).

Goodman & Novacky (1994) e Dangl & Jones (1996) relacionam grande parte da resposta de resistência à indução por Avr gene e R gene. A distinção marcada pela interação gene a gene promove a ativação da resposta de Hipersensibilidade, RH. A planta pode responder também ao ataque de nematóides com a síntese de metabólitos antimicrobianos (fitoalexinas); e/ou

síntese de enzimas que podem ser nocivas ao patógeno (quinases e glucanases); e/ou reforços de paredes celulares da área infectada.

Dixon & Lamb (1990) constataram a utilização de sinais de defesa que incluem Ca^{+2} e de outros íons, mudanças na fosforilação de proteínas, ativação de oxigênio em outros superóxidos, produção de ácido salicílico, que induziriam a formação de compostos secundários, também denominados 'Efeitos Cascata', eventos que ocorrem concomitantemente e que disparariam as defesas da planta. O sucesso dessas respostas ocorre com as plantas resistentes, que não se tornam hospedeiras. Já nas plantas suscetíveis, essas respostas não seriam eficientes para controlar e impedir a reprodução do patógeno, não combatendo com sucesso as infecções, ocasionando a perda de produtividade.

Um exemplo interessante de reação de hipersensibilidade (RH) ocorre na família Solanaceae, na qual uma rápida e localizada morte celular acontece na planta infectada em resposta ao ataque do nematóide. Juvenis de segundo estágio que aparecem envolvidos por células necrosadas, falharam no seu desenvolvimento e morreram. A resposta pode ocorrer precocemente e desta forma prevenir a penetração ou a migração de J2s. Se ocorrer tardiamente, inibe o desenvolvimento de células gigantes, suprimindo o desenvolvimento e a reprodução do parasita. Vários autores descrevem a RH como uma reação local, acompanhada pela produção ou liberação de formas de oxigênio reativo, ácido salicílico e/ou compostos fenólicos, ou outros compostos envolvidos no caminho da sinalização extracelular. A ativação de genes de defesa, alterações estruturais (especialmente paredes celulares reforçadas) e síntese de fitoalexinas sintéticas também podem ser freqüentemente observadas. Estes

fenômenos ocorrem no local de infecção, alguns minutos depois da penetração (Pegard *et al.*, 2005).

4 METODOLOGIA

4.1 Produção de mudas de *Pfaffia glomerata*

Foram utilizados nos experimentos 13 acessos de *P. glomerata*, oriundos de várias regiões do Brasil (Tabela 1). Procedentes da Coleção de Plantas Medicinais da UnB, sob a responsabilidade do Prof. Dr Jean Kleber de Abreu Mattos, e na Coleção do Cenargen sob a responsabilidade do Dr Roberto Fontes Vieira.

4.2 Identificação e produção do inóculo de *Meloidogyne incognita*

A população de *M. incognita* raça 1 foi isolada, identificada e purificada a partir de plantas de *Pfaffia* produzidas em Brasília - DF. A identificação da espécie foi feita através do perfil de esterase (Carneiro & Almeida, 2001; Carneiro *et al.*, 2000) e teste com hospedeiros diferenciadores (Hartman & Sasser, 1985). As plantas foram mantidas em casa de vegetação, sob condições de temperatura controlada (25 a 30 °C). Para obtenção do inóculo essa população foi multiplicada em tomateiros grupo Santa Cruz. Os ovos foram extraídos pelo método clássico de Hussey & Barker (1973) e a concentração determinada em lâminas de Peters ao microscópio de luz. Para os estudos histopatológicos, foram obtidos juvenis de segundo estágio (J2), deixando-os eclodir em funil de Baermann, modificado (Flegg, 1967).

TABELA 1 – Descrição dos acessos de *Pfaffia glomerata*, utilizados nos experimentos de seleção, quanto à resistência a *Meloidogyne incognita* raça 1

Nome do acesso	Local de Depósito	Origem
Cenargen2217-10	Coleção Cenargen	Ilha Grande,Sto Antônio(PR)
São Luís(MA)	Coleção UnB	São Luís-(MA)
Cenargen2216-10	Coleção Cenargen	Ilha do Estreito(PR)
UFV(MG)	Coleção UnB	Campus da Univ. Federal de Viçosa-(MG)
Itabaiana(SE)	Coleção UnB	Ribeirópolis,(SE)
Cenargen2213-6	Coleção Cenargen	Ilha do Denzel (PR)
Pedra de Guaratiba(RJ)	Coleção UnB	HFlorestal da Pedra de Guaratiba-(RJ)
Farmacotécnica(DF)	Coleção UnB-	Vargem Bonita (DF)-Propriedade da Farmacotécnica
Cenargen 2217-9	Coleção Cenargen	Ilha Grande(PR)
Cenargen 1	Coleção UnB	Brasília(DF)
Cenargen2216-16	Coleção Cenargen	Ilha Marçal (PR)
IAPAR(PA)	Coleção UnB	IAPAR-(PR)
UFC(CE)	Coleção Unb	Campus da Universidade Federal do Ceará – CE)

4.3 Multiplicação Unidonal de *Pfaffia glomerata*

Nós, contendo duas gemas, foram selecionados de estacas da parte aérea das plantas mãe, e em condições de telado sombreado, foram postos a brotar em mini estufas construídas sob vasos plásticos de 2,5 litros, contendo substrato esterilizado com 50% húmus e 50% argila. Cada vaso foi coberto com um saco plástico transparente de 4 litros, constituindo uma mini estufa. As extremidades do saco plástico foram cortadas para permitir aeração. Os vasos não receberam irrigação por aproximadamente 10 dias. À medida em que surgiam brotações, aproximadamente aos 5 dias, os sacos foram retirados, e as mudinhas receberam irrigação. Depois desse período, as plântulas foram removidas para estufas de crescimento individual, em vasos de 5 litros, visando o enraizamento e crescimento das para posterior inoculação.

Estes experimentos foram conduzidos na Estação Biológica da UnB, nos meses de agosto e setembro de 2004 e posteriormente, do mês de outubro de 2004 até o mês de dezembro de 2006, em casa de vegetação no Cenargen.

4.4 Reação dos diferentes acessos de *Pfaffia glomerata* a *Meloidogyne incognita*

Oito plantas de cada acesso (Tabela 1), cultivadas individualmente em vasos de 5 litros foram inoculada com 5000 ovos (10 ml de suspensão aquosa) de *M. incognita* raça 1, quando apresentavam aproximadamente 15 cm de altura. O inóculo foi distribuído na região da rizosfera, aproximadamente de 1 a 2 cm de distância do caule. O ensaio foi conduzido em delineamento experimental, inteiramente casualizado e mantido em casa de vegetação sob condições controladas de temperatura (25 a 30 ° C).

Cento e vinte dias após a inoculação, a parte aérea foi cortada e descartada, as raízes lavadas e coradas com Floxina-B por 30 minutos numa concentração de 0,015 mg por ml. Em seguida foram estimados os parâmetros: índices de galhas e massa de ovos, segundo a escala de 0 a 5 proposta por (Hartman & Sasser, 1985): onde 0 = nenhuma galha ou massa de ovos; 1 = 1-2 galhas ou massas de ovos, 2 = 3-10; 3 = 11-30; 4 = 31-100; 5 \geq 100 galhas ou massas de ovos. O número total de ovos/planta/repetição foi avaliado como descrito anteriormente por Hussey & Barker (1973) com NaOCl a 1%. O Fator de Reprodução (FR) foi calculado, dividindo-se o número total de ovos/planta pelo número de ovos inoculados (5000). O número total de ovos foi transformado em $\log(x+1)$ para a análise de variância e os dados analisados pelo Teste de Tukey- Kramer. Foram consideradas resistentes plantas que apresentaram o FR menor que 1.0.

4.5 Histopatologia comparada em plantas resistentes e suscetíveis a *Meloidogyne incognita* raça 1

Considerando os resultados do primeiro ensaio (FR e maior peso das raízes), foram escolhidos os acessos UFV (MG) como resistente e o Farmacotécnica (DF) como suscetível.

As plântulas de *P. glomerata* foram preparadas como descrito acima. Quinze dias após a emergência, as plântulas foram transferidas para vasos contendo 1 litro de areia esterilizada. Quando as plantas estavam com 12-15 cm de altura foram inoculadas com 20.000 J2s/planta, obtidos através do método de Flegg, (1967) e quantificados em lâmina de Peters.

As avaliações foram realizadas aos 4, 10, 20, 28, 34, 39 e 41 dias após a inoculação, retirando-se uma planta resistente e outra suscetível, em cada um desses tempos, utilizando-se a técnica descrita por Pegard *et al.*, (2005), como segue: as plantas foram cuidadosamente extraídas do substrato para que as raízes não se danificassem, dentro de béqueres com água limpa. A parte aérea foi cortada e descartada, e as raízes foram lavadas em água corrente. Extremidades de raiz, com 3 mm de comprimento, que continham galhas ou não, foram retiradas, com auxílio de um bisturi e pinça fina ao microscópio estereoscópico. A seguir, foram fixadas em solução 1% (v:v) de glutaraldeído e 4% (v:v) de formaldeído em 100mM de tampão fosfato, pH 7,2, à temperatura ambiente. A seguir, foram mantidas sob agitação em agitador rotatório, para melhor contato das raízes com a solução fixadora, resultando numa melhor fixação, sem a formação de bolhas em seu interior.

Depois de fixadas, as extremidades das raízes foram lavadas por duas vezes, a cada 30 minutos, com tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,2 e em seguida desidratadas, sob agitação, em série etanólica crescente, de 10 a 100% com intervalos de 20 minutos entre as trocas; sendo repetidos 2 vezes, os banhos com a concentração de 100%. As extremidades de raízes foram embebidas em Technovit 7100 (uma resina epoxy produzida por Kulzer Friedrichsdorf, Alemanha), também sob agitação a 4 °C, e de acordo com o protocolo do fabricante. Secções longitudinais de 3,5 µm foram montadas, uma a uma, num total de 8614 cortes, sobre gotas de água, numa lâmina de vidro e postas para secar em placa aquecedora a 50° C 'overnight'. Os cortes foram observados, examinados e fotodocumentados, primeiramente sob luz UV num filtro de 365 nm de excitação e 397 nm de emissão para observação da reação

de hipersensibilidade, em Microscópio de luz, Axiophot Zeiss. Novas observações foram feitas e fotodocumentadas com os cortes corados com a solução aquosa de azul de toluidina a 1%. Foram feitas observações nos acessos resistente e suscetível.

Depois de retiradas as amostras para microscopia as raízes das plantas suscetível, resistente e o controle, foram coradas com fucsina ácida, para a observação da penetração de J2, segundo a metodologia descrita por Bird *et al.*, (1983), apresentada a seguir: as raízes foram lavadas, mergulhadas em 200ml de solução de hipoclorito de sódio 5,25% (NaOCl), durante 4 minutos, com repetidas agitações. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 45 segundos, e mergulhadas por 15 minutos em água corrente para retirada do excesso de hipoclorito. Após a retirada da água, as raízes foram transferidas para um béquer de 2 ml da solução de fuccina ácida (1,25g de fucsina ácida, 125ml de ácido acético glacial e 375ml de água destilada). A solução e as raízes foram fervidas no microondas por 30 segundos, em alta temperatura. Depois de frias, foram descoradas com água quente, permanecendo somente alguns pontinhos corados nas raízes. Após a retirada da água, as raízes foram transferidas para uma placa de Petri e observadas ao Microscópio estereoscópico, Zeiss, e as partes das raízes que ficaram coradas de vermelho e indicavam a presença de nematóides, foram coletadas em uma lâmina com uma gotícula de glicerol puro, e levadas ao Microscópio de luz, Axiophot, Zeiss, para serem analisadas e fotodocumentadas.

5 RESULTADOS

5.1 Resistência de acessos de *Pfaffia glomerata* a *Meloidogyne incognita*

Os acessos São Luís (MA), UFV (MG), Cenargen 1 (DF), Pedra de Guaratiba (RJ), Itabaiana (SE) e Cenargen 2213-6 foram considerados altamente resistentes por apresentarem Fator de Reprodução menor que 1 ($FR < 1$); IAPAR (PR), Cenargen 2216-10 e Cenargen 2216-16, medianamente resistentes ($FR = 1,9$ a $2,3$); Cenargen 2217-10 e UFC (CE), suscetíveis ($FR = 10$). Os demais acessos Farmacotécnica (DF) e Cenargen 2217-9 foram altamente suscetíveis ($FR > 80,0$). De uma maneira geral, ocorreu grande diferença no FR entre os acessos resistentes e os suscetíveis, mostrando com evidência a presença de genes de resistência altamente efetivos em alguns acessos (Fig. 2) (Tabela 2).

Pode-se observar através dos índices de galhas (IG) que os acessos altamente resistentes, apresentaram valores em torno de 3, mostrando que ocorreu desenvolvimento de alguns nematóides, embora eles não tenham atingido o estágio adulto, o que fica evidente através do $FR < 1$. O índice de massas de ovos foi desconsiderado nas avaliações pois muitas massas de ovos foram internas e não permitiram a coloração com a Floxina B.

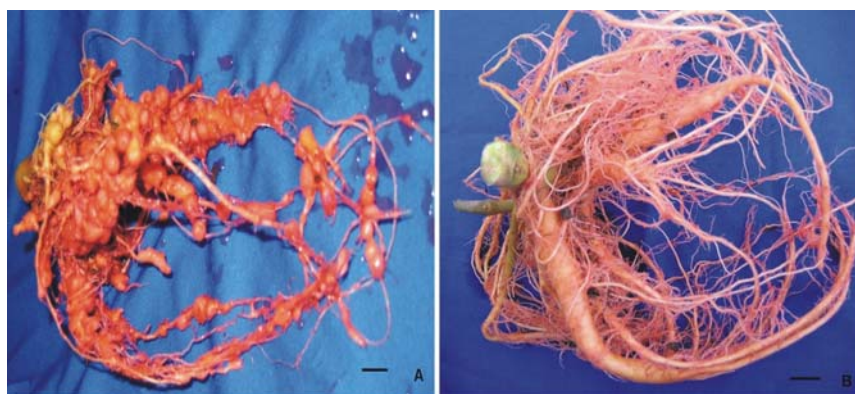


Figura 2. Sintomas das raízes de *Pfaffia glomerata* infestadas com *Meloidogyne incognita*. A: acesso Farmacotécnica (suscetível); B: acesso UFV (resistente).

TABELA 2 – Respostas dos diferentes acessos de *Pfaffia glomerata* ao nematóide das galhas *Meloidogyne incognita*.

Nome do acesso	Peso fresco das raízes (g.)	Índice de Galhas *	Número Total de Ovos	Fator de Reprodução*	Erro Padrão da Média	Reação final ***
Cenargen 2217-10	139,0g	5	554.835	110,967 d	±0,1044	AS
São Luís (MA)	42,5	3	35	0,007 a	±0,1044	AR
Cenargen 2216-10	114,5	4	10.175	2,035 ab	±0,2993	MR
UFV (MG)	88,0	3	635	0,127 a	±0,1044	AR
Itabaiana (SE)	232,0	3	2.815	0,563 a	±0,2993	AR
Cenargen 2213-6	114,2	3	4.230	0,846 a	±0,2993	AR
Pedra de Guaratiba(RJ)	69,0	3	1.795	0,359 a	±0,1044	AR
Farmacotécnica DF	176,0g	5	411.395	82,279 d	±0,1205	AS
Cenargen 2217-9	60,0g	5	53.520	10,704 bc	±0,2993	S
Cenargen 1	72,5	3	1.410	0,282 a	±0,1044	AR
Cenargen 2216-16	118,0g	4	11.390	2,278 b	±0,3457	MR
IAPAR(PA)	131,0g	5	9.305	1,861 ab	±0,2993	MR
UFC(CE)	131,0	5	54.600	10,920 bc	±0,1044	S

(*) Índice de galhas ou massas de ovos: 0 = nenhuma galha ou massa de ovos; 1 = 1-2 galhas ou massas de ovos, 2 = 3-10; 3 = 11-30; 4 = 31-100; 5 ≥ 100 galhas ou massas de ovos (Hartman&Sasser, 1985).

(**) Os valores foram transformados em log (x+1) e tratamentos com letras diferentes, diferem entre si pelo teste Tukey-Kramer ao nível de 5 % de propabilidade.

(***) **S** = suscetível, **MR** = moderadamente resistente, **AR** = altamente resistente, **S**= suscetível **AS** = altamente suscetível.

5.2 Histopatologia comparada em plantas resistentes e suscetíveis a *Meloidogyne incognita* raça 1

Dentre os acessos **AR e AS** (altamente resistente e suscetível), escolheu-se como padrão de resistência o acesso que apresentou raízes com maior peso da matéria fresca, ou seja, UFV (MG) e Farmacotécnica (FAR), respectivamente.

A penetração nas raízes do acesso resistente UFV foi muito inferior ao acesso suscetível (FAR). Isto evidenciou-se ao confrontarmos a frequência dos engrossamentos encontrados nos dois acessos: muito freqüentes em FAR e raros em UFV

5.3 Observações histológicas das raízes infectadas suscetíveis, acesso Farmacotécnica

Exames de radículas coradas com fuccina ácida e aproximadamente 4.307 cortes corados com azul de toluidina, demonstraram que os J2s de *M. incognita* foram capazes de penetrar, nem sempre pela zona de alongação, migrar e se desenvolver normalmente (Fig. 3). Muitos invadiram a região sub-apical e atingiram a área vascular diferenciada, desenvolvendo células gigantes bem formadas, multinucleadas e com membranas delgadas (Fig. 3B). Observações nas raízes coloridas com fucsina ácida, revelaram a presença de J2s na região subapical, aos 4 e 6 dias após a inoculação, enquanto secções histológicas coradas com azul de toluidina revelaram muitos J2s a caminho do cilindro central. Aos 10 dias, em outras secções, foram observados J2s alimentados. Aos 19 dias (Fig. 3A), numerosos J3/J4s já tinham estabelecido sítios de alimentação com o número de 5 a 14 células gigantes (dependendo do plano de

corde). Estas células apresentavam-se com membranas de aspecto normal, numerosos núcleos, citoplasma denso, e alguns vacúolos em seu interior (Fig. 3B). Vários sítios foram observados dentro da região vascular (Fig. 3D), onde, em alguns cortes foram observados alguns J3/J4s se alimentando. Sua localização próxima aos vasos indicou que a formação dos sítios iniciou-se em células do parênquima pouco diferenciadas (Fig. 3C e 3D). Aos 28 dias apareceram as primeiras fêmeas, que se alimentavam em células gigantes bem formadas, com vários pequenos núcleos e poucos vacúolos (iniciou-se a ovoposição nesse período). Aos 39 dias, fêmeas bem desenvolvidas foram observadas, com primórdios da matriz gelatinosa glicoprotéica e as camadas superficiais da raiz apresentavam-se rompidas (Figuras 3E e 3F).

5.4 Observações histológicas das raízes infectadas resistente, acesso UFV.

Exames de radículas coradas com fuccina ácida e aproximadamente 4.307 secções coradas com azul de toluidina demonstraram que dos poucos J2s que penetraram as raízes do acesso resistente UFV, alguns J2s migraram até a região do cilindro central da raiz (Fig. 4D), nem sempre pela zona de alongação, e não conseguiram estabelecer os sítios de alimentação. Esses J2s foram encontrados em estado degenerado, junto a lesões necróticas (Fig. 4A, C), próximos à região dos vasos condutores. A região próxima ao nematóide localizada dentro das raízes mostrou células parasitadas de coloração azul escuro, com citoplasma colapsado e núcleos não visíveis (Fig. 4A, C). Outros J2s conseguiram estabelecer os sítios de alimentação (células gigantes) e sofreram ecdises, atingindo os estádios J3/J4s (Fig. 4E, F). As células gigantes

formadas por esses nematóides, junto aos vasos condutores (Fig. 4G), foram menores que as observadas no acesso suscetível e apresentavam um número bem maior de vacúolos (Fig. 4E).

Quando as raízes resistentes foram observadas à luz UV, uma autofluorescência azul esbranquiçada foi observada. Essa coloração é típica da formação de compostos fenólicos ligados à reação de hipersensibilidade (RH). Essa reação foi observada dentro das células e nas paredes celulares, ocorrendo logo no início do parasitismo (4 dias), impedindo que os J2s estabelecessem os sítios de alimentação (Fig. 4B) e com juvenis J3/J4s (Fig. 4H, J), que já haviam iniciado o estabelecimento dos sítios. Pôde-se observar também, vasos condutores com autofluorescência azul-esbranquiçada (Fig. 4H), demonstrando a presença de lignina.

Aos 19 dias foram observados J3/J4s junto ao cilindro central. As células gigantes apresentaram-se mal formadas, pequenas e em menor número (2-7), quando comparadas às da planta suscetível (Fig. 4E, G). A membrana plasmática, apresentou-se mais espessa, quando comparada à planta suscetível. Observou-se também um grande número de vacúolos colapsados (Fig. 4E) e um menor número de núcleos (Fig. 4E). Nesse período, foram observados à luz UV, J3/J4s com autofluorescência azul, podendo indicar que esses juvenis absorveram compostos fenólicos, sugerindo uma degeneração do seu citoplasma (Fig. 4F, 4J).

Aos 28 e 39 dias observou-se os J3/J4s dispostos junto aos seus sítios de alimentação. As células gigantes apresentavam-se com aspecto degenerado e muito vacuolizadas (Fig. 4I). Aos 41 dias, os mesmos fenômenos foram observados onde J3s e J4s apresentavam degeneração citoplasmática. Em

nenhuma secção foi observado o estágio de fêmea, confirmando o baixíssimo fator de reprodução deste acesso.

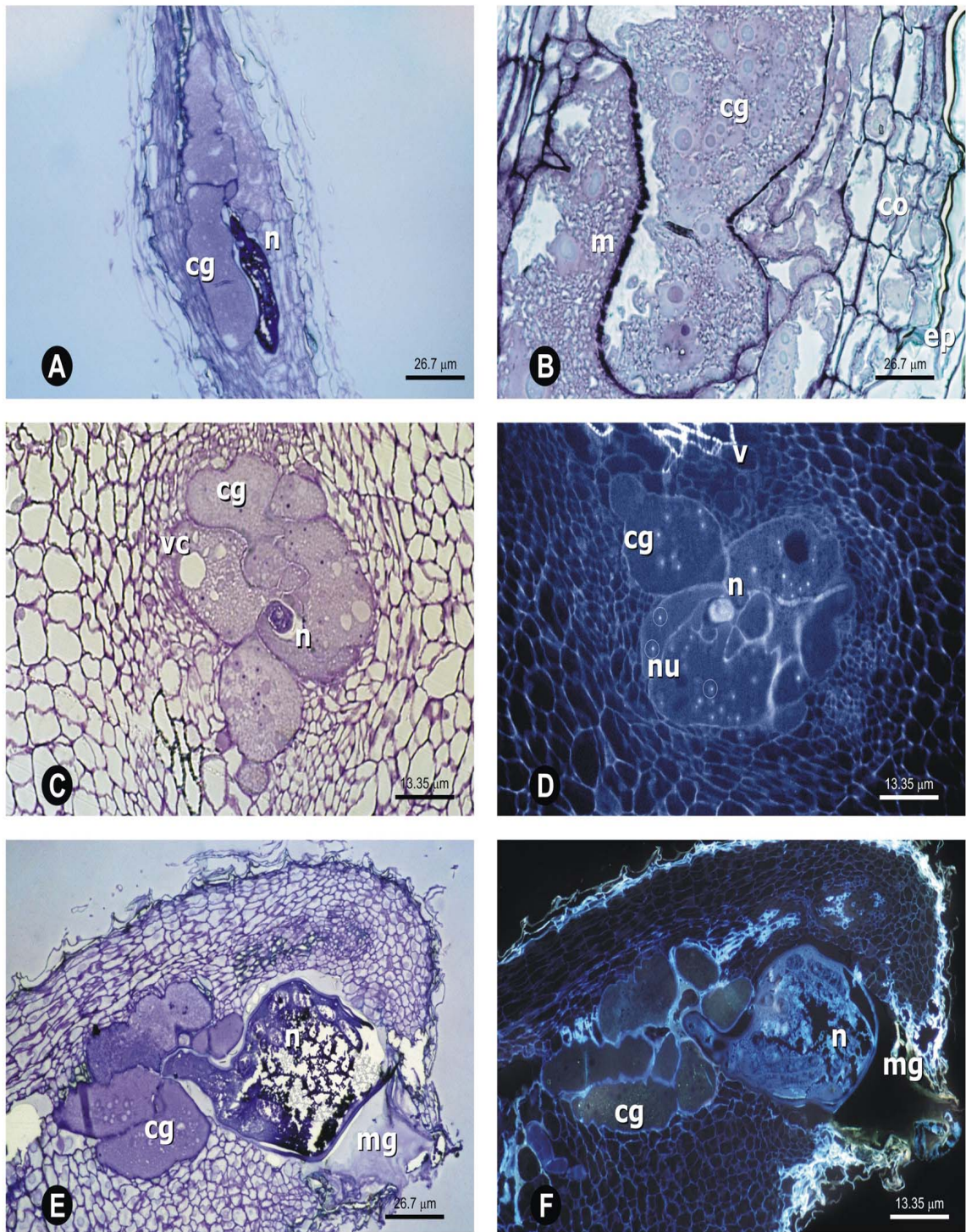


Figura 3. Secções longitudinais em raízes de *Pfaffia glomerata* suscetível (acesso Farmacotécnica) inoculadas com *Meloidogyne incognita* raça 1. A,B,C,E : secções coradas com toluidina azul. D,F: secções não coradas, observadas ao UV. cg = célula gigante, n=nematóide, m = membrana, vc = vacúolo, co = córtex, ep = epiderme, nu = núcleos, mg = matriz gelatinosa.

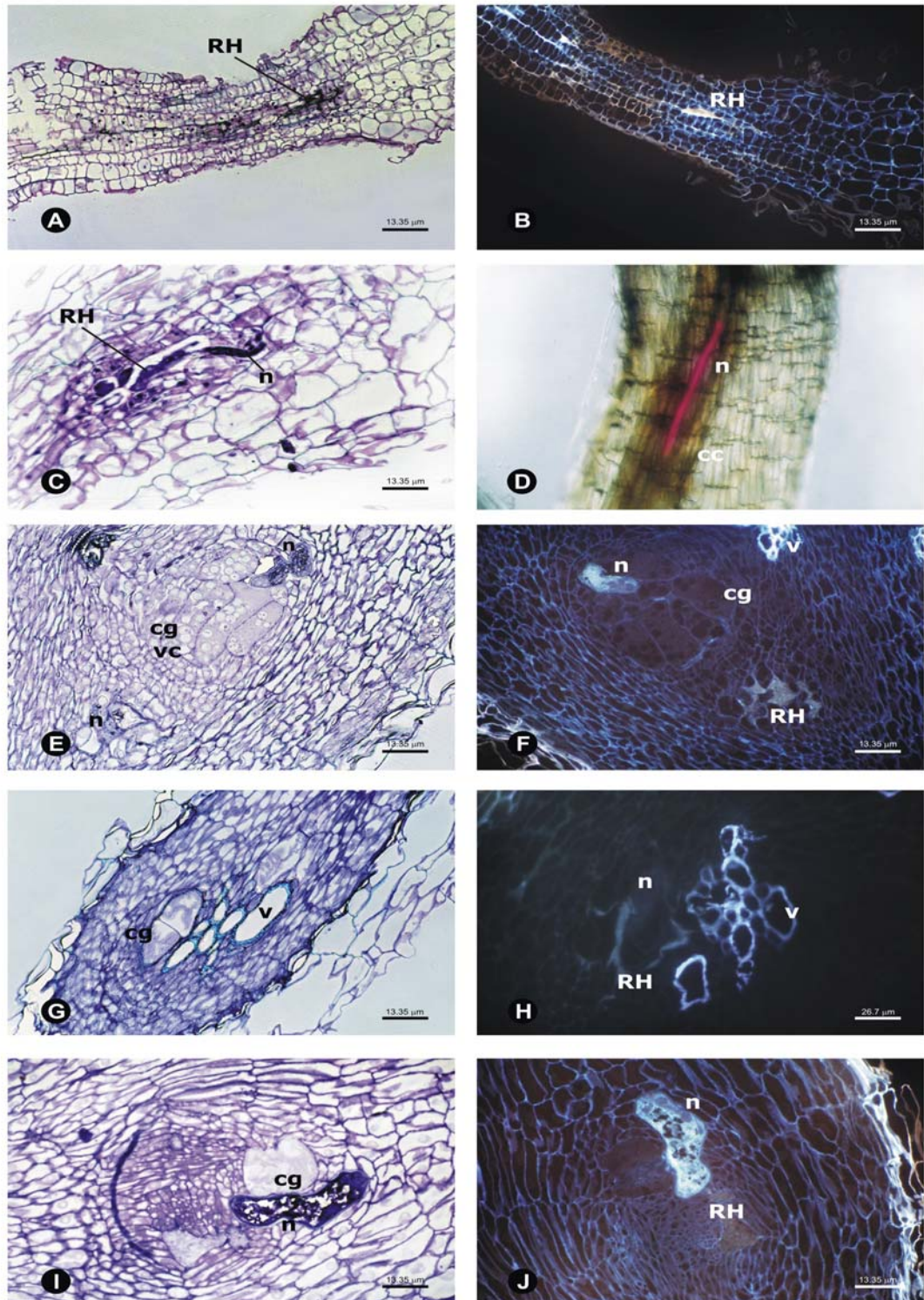


Figura 4: Raízes de *Pfaffia glomerata* resistente (acesso UFV) inoculada com *Meloidogyne incognita*. A,C,E,G,I: secções coradas com toluidina azul. B,F,H, J: secções não coradas, observadas à luz UV. D: radícula corada com fuccina ácida, cg = célula gigante, n = nematóide, RH = reação de hipersensibilidade, vc = vacúolo, cc = cilindro central, v = vasos

6 DISCUSSÃO

O primeiro objetivo deste trabalho foi selecionar plantas de *P. glomerata* resistentes a *M. incognita* raça 1. Pôde-se observar uma grande variabilidade dos acessos de *P. glomerata* quanto à resistência genética a esse nematóide (FR variando de 0,007 a 110,0). Isso pode ser explicado devido à grande variabilidade existente entre diferentes acessos dessa planta, como foi demonstrado previamente por Corrêa Júnior (2003). Esse mesmo autor descreveu diferenças fenotípicas entre os acessos tanto na cor, tamanho e forma das folhas. Essa variabilidade genética pôde ser observada nas folhas dos acessos selecionados como suscetível Farmacotécnica (folha lanceolada) e resistente UFV (folha ovalada). A resistência genética de *P. glomerata* já foi testada para *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 e vários acessos foram descritos como resistentes (Araújo *et al.*, 1994). Dessa maneira, verifica-se que os acessos São Luís, Itabaiana e Pedra de Guaratiba foram altamente resistentes às duas espécies (*M. javanica* e *M. incognita*) e o acesso Farmacotécnica, altamente suscetível a ambas. Ocorreu variabilidade quanto à resistência do acesso IAPAR, que foi altamente resistente a *M. javanica* e moderadamente resistente a *M. incognita*. Apenas o acesso UFC, diferiu acentuadamente quanto a sua resistência genética, sendo suscetível a *M. incognita* e altamente resistente a *M. javanica*, de acordo com o que foi relatado por (Araújo *et al.*, 1994). Nesse trabalho foi utilizado como parâmetro de resistência, o índice de galhas e de massas de ovos, que de acordo com os resultados do presente estudo, não foram bons índices para medir a resistência genética, uma vez que as massas de ovos foram muitas vezes internas e as

galhas algumas vezes foram formadas por juvenis (J3/ J4), que não conseguiram completar o ciclo biológico.

O segundo objetivo deste trabalho foi analisar a penetração e subsequente desenvolvimento de *M. incognita* em dois acessos de *P. glomerata* suscetível (Farmacotécnica) e resistente (UFV). Comparando essas duas plantas pôde-se observar dois tipos de resistência. Inicialmente, um tipo que suprimiu a penetração dos J2s e o outro tipo que bloqueou ou dificultou o desenvolvimento após a penetração.

A resistência de plantas pode ocorrer em diferentes níveis. A dificuldade do J2 em penetrar as raízes resistentes de *P. glomerata* pôde indicar barreiras físicas. Essas barreiras já foram sugeridas previamente em videira resistente (Anward & McKenry, 2002), para uma cultivar de algodão (Anward *et al.*, 1994) e para uma cultivar de soja (Dropkin & Nelson, 1960). Isso pode também indicar que as raízes não atraíram ou mesmo repeliram os J2s ou que os J2s penetraram e saíram das mesmas. Isso já foi demonstrado para cultivares resistentes de algodoeiro (Carneiro *et al.*, 2005; Mc Clure *et al.*, 1974). Esse tipo de proteção foi demonstrada para o pepino *Cucumis sativus* onde um triterpeno, curcubitacin, que repeliu os J2s de *Meloidogyne* foi isolado a partir dos exsudatos radiculares. Da mesma maneira, aminoácidos exsudados a partir das raízes de *Sesamum indicum* demonstraram um efeito nematostático em J2s de *Meloidogyne* (Tanda *et al.*, 1989).

Interações entre espécies de *Meloidogyne* com os seus hospedeiros implicam em complexos mecanismos (Williamson & Gleason, 2003). Observações microscópicas da interação entre *M. incognita* e *P. glomerata* revelaram modificações histológicas importantes em ambos organismos. A

penetração das raízes e o desenvolvimento de nematóides no cultivar suscetível confirmou observações prévias para espécies de *Meloidogyne* nos seus hospedeiros (von Mende, 1997). Os J2s penetraram as raízes de fáfia através da região apical, nem sempre pela zona de alongação, e migraram para a região do cilindro vascular. Embora os J2s estivessem localizados entre as células, a invasão das raízes foi associada à modificação das paredes celulares. Células alteradas próximas ao nematóide, localizadas em diferentes tecidos, mostraram condensação do citoplasma colorido em azul escuro. Essa resposta de pós-penetração nas raízes do acesso resistente, pode ser considerada uma clássica reação de hipersensibilidade (RH). Como já foi referido por diferentes autores para várias plantas (Grundler *et al.*, 1997; Kaplan, 1978; Paulson & Webster, 1972; Sillero & Rubiales, 2002; Valette *et al.*, 1998). A RH em *P. glomerata* acesso UFV envolveu lesões necróticas que limitaram a alimentação e o desenvolvimento do nematóide. Entre as moléculas que podem ter ativamente contribuído para a defesa da planta contra os nematóides e outros patógenos estão os compostos fenólicos que são freqüentemente citados. (Bajaj & Mahajan, 1977; Bingefors, 1982; Giebel, 1970; Huang & Rhode, 1973; Kaplan, 1978; Milne *et al.* 1965; Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Paulson & Webster, 1972). Neste estudo, cortes histológicos observados à luz UV mostraram uma associação entre compostos fenólicos que aparecem autofluorescentes (Klement *et al.*, 1990) e resistência ao nematóide de galhas. Na realidade, esses compostos se acumularam dentro das células nos tecidos danificados, próximos aos J2s ao migrarem, logo no início do processo infectivo, somente no acesso resistente. O mesmo pôde ser observado para os J3s-J4s, associados a sítios de alimentação colapsados. Os compostos fenólicos se concentraram em

um pequeno número de células e no espaço intracelular do tecido da raiz, ao redor dos J2-J3-J4s quando observados à luz UV. Esse fenômeno também foi observado por Pegard *et al.*, (2005) somente para os J2s, onde identificaram o ácido clorogênico como o composto fenólico mais importante na linhagem resistente de pimentão quando invadida pelos nematóides. O ácido clorogênico é conhecido por afetar a coordenação motora do nematóide (Huang & Rhode, 1973). Outro trabalho mostra que as formas oxidadas dos compostos fenólicos, que também ocorrem em alta concentração em raízes de tomateiros resistentes, contribuíram para a resistência a *M. incognita* (Bajaj & Mahajan, 1977) por criarem um meio tóxico para penetração e multiplicação do nematóide.

Uma outra interessante observação nas raízes da planta resistente infectada foi a ocorrência de pequenos sítios de alimentação ao lado de áreas com RH, onde células gigantes foram facilmente reconhecidas através do tamanho reduzido e a presença de poucos núcleos e muitos vacúolos, citoplasma degenerado e membrana celular espessa. Esses sítios de alimentação fracamente diferenciados foram freqüentemente associados aos nematóides degenerados (autofluorescentes azul esbranquiçado), que algumas vezes atingiram os estádios (J3-J4). Parece que o mecanismo de defesa das células de *P. glomerata* deve ter sido ativado tardiamente, após a morte das células que sofreram RH próximas ao nematóide. Esse processo inibiu: I) a transição dos J2-J3-J4s para estádios adultos, e II) a completa diferenciação dos sítios de alimentação. Esse mesmo mecanismo de resistência foi observado no cafeeiro resistente 'IAPAR 59' por Anthony *et al.*, (2005).

Juvenis que superaram a defesa da planta atingiram o estágio de fêmeas maduras. Isso foi constatado ao se observar o pequeno número de ovos extraídos a partir das raízes da planta resistente (Tabela 1).

Mais pesquisas são necessárias no sentido de compreender mais profundamente os mecanismos envolvidos na resistência dos diferentes acessos de *P. glomerata*, seja a nível celular ou molecular. Esta pesquisa deve estender-se também a outras espécies de *Meloidogyne* encontradas causando danos a essa planta, como é o caso de *M. javanica* e *M. arenaria*.

7 CONCLUSÕES

Os acessos de *Pfaffia glomerata* apresentaram diferentes níveis de resistência e suscetibilidade quanto ao nematóide de galhas, *Meloidogyne incognita*, demonstrando haver acentuada variabilidade para a resistência.

Os acessos São Luís (MA), UFV (MG), Cenargen 1 (DF), Pedra de Guaratiba (RJ), Itabaiana (SE) e Cenargen 2213-6 foram considerados altamente resistentes (FR<1), apresentando alto potencial para uso em programas de melhoramento genético.

Os acessos IAPAR (PR), Cenargen 2216-10 e Cenargen 2216-16 foram medianamente resistentes (FR de 1,9 a 2,3); Cenargen 2217-10 e UFC (CE), suscetíveis (FR=10,0) e os demais acessos Farmacotécnica, (DF) e Cenargen 2217-9, altamente suscetíveis (FR >80,0).

A resistência do acesso UFV de *P. glomerata* foi associada primeiramente a um mecanismo pré-infectivo não identificado que limitou a penetração do nematóide nas raízes.

A resistência também esteve associada a um mecanismo de resistência pós-infectivo, bioquímico, que evidenciou uma resposta de hipersensibilidade, relacionada aos compostos fenólicos, que aparentemente bloquearam o desenvolvimento dos juvenis (J2-J3-J4) ao estágio de fêmea adulta.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. London: Academic Press.1988. p.115 - 142

ALCÂNTARA M. F. A. **Atividade antimicrobiana de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen XIII**. Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Fortaleza – CE. 1994. p 072.

ALVES, M.N. **Tissue culture of *Pfaffia* sp Kuntze (Amaranthaceae) aiming vegetative micropropagation and the induction of friable callus for future cell suspension culture**. XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Florianópolis - SC. 1996. p 025.

ANWARD, S. A.; TRUDGILL, D.L.; PHILIPPS, M.S. The contribution of variation in invasion and development rates of *Meloidogyne incognita* to host status differences. **Nematologica**, v.40, p.579-586, 1994.

ANWARD, S.A; MC KENRY, M.V. Developmental response of a resistance-breaking population of *Meloidogyne arenaria* on *Vitis* spp. **J. Nematology**,v.34, p. 28-33, 2002.

ANTHONY, F; TOPART, P.; MARTINEZ, A.; SILVA, M.; NICOLE, M. Hypersensitive- like reaction conferred by the *Mex-1* resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. **Plant Pathology**, v. 54, p. 476 - 482, 2005.

ARAÚJO, W. P; MATTOS, J. K.A. ; SOUZA, R. M. Fontes de resistência a *Meloidogyne javanica* entre procedências de *Pfaffia glomerata*. **Fitopatol. Bras.** v. 19 (Supl.), p. 322-323, 1994.

ATKINSON, H.J. Plant-nematode interactions:Molecular and genetics basis.. In: Kohmoto, K.; Singh, U.S. and Singh, R.P. (eds). **Pathogenesis and Host-Parasite specificity in Plant Diseases: Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases**. Oxford, UK: Pergamon, Press,1994, p 355-369.

BAJAJ, K.L.; MAHAJAN. Phenolic compounds in tomato susceptible and resistant to *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White). Chitwod. **Nematol. Mediterr.** v. 5, p. 329-333,1977.

BALDWIN, J.G.. Evolution of the cyst and noncyst-forming Heteroderinae. **Ann. Rev. Phytopatology** v. 30, p. 271 – 290,1992.

BARKER, K.R.; HUSSEY, R.S.; KRUSBERG, L.R.; BIRD, G.W.; DUNN, R.A.; FERRIS, H.; FERRIS, V.R.; FRECKMAN, D.W.; GABRIEL, C.J.; GREWAL, P.S.; MACGUIDWIN, A.E.; RIDDLE, D.L.; ROBERTS, P.A. ; SCHMITT, D.P. Plant and soil nematodes: societal impact and focus for future. **J. Nematol.**, v. 26, 127-137,1994.

BARRONS, K. C. Studies of the nature of root-Knot resistance. **J. Agricultural Research** v. 58, 263-271, 1939.

BINGEFORS, S. **Nature of inherited nematode resistance in plants.. in: Pathogens vectores and plant diseases: Approches to control.** K.F. HARRIS; K MARAMOROSH, eds. Academic Press, New York, 1982 , p187 - 219.

BIRD, A.F.; DOWNTON, J.S.; HAWKER, J.S. **Cellulase secretion by second stage larvae of the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*).** Marcellia, 1974 vol. 38, 165-169.

CARNEIRO, R.M.D.G.; NEVES,D.I.; FALCÃO, PAES, N.S.; CIAS, E; GROSSI DE SÁ, M.F. Resistência de Genótipos de algodoeiro a *Meloidogyne incognita* raça 3: reprodução e histopatologia. **Nematologia Brasileira.** v. 29, p. 1-10, 2005.

CARNEIRO, R.M.D.G; ALMEIDA M.R.A.;QUÉNÉHÉRVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. isolates. **Nematology**, v. 2, p. 645 – 654. 2000.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira** 2001 v. 25, p. 35-44.

COOK, R. ; EVANS, K. Resistance and tolerance. In: Brown, R.H. and Kerry, B.R. (eds) **Principles and Practice of Nematode Control in Crops**. Sydney, Academic Press, 1987. p.179-231.

COOK, R. Resistance in plants to cyst and root-knot nematodes. **Agricultural Zoology Reviews**, v. 4, p. 213-240, 1991.

CORRÊA JÚNIOR ,C. **Estudo agrônômico de fáfia [*Pfaffia glomerata* Spreng.) Pedersen]: Sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de β -Ecdisona em diferentes acessos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul** , Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003 Tese de Doutorado, 69p.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; CORTEZ, D. A. G. **Aspectos gerais da espécie fáfia (*Pfaffia glomerata pedersen*) e recomendações técnicas para o seu cultivo**. Monografia apresentada na I Jornada Iberoamericano de Agrotecnologia de Plantas Medicinales. 19 a 23 de agosto de 2002. CYTED/ Centro Iberoamericano de Formacion. Guatemala - Antigua, 11p., 2002. (SNT).

DANGL, J.L.; DIETRICH, R.A.; RICHBERG, M.H. Death don't have no mercy; Cell death programs in plant-microbe interactions. **Plant Cell** v. 8, p. 1793-1807, 1996.

de BOER, J.; SMANT, G.; GOVERSE, A.; DAVIS, E.L.; OVERMARS, H.A.; POMP, H.; VAN GENT-PELZER, M.; SILVERENTANT, J.F.; STOKKERMANS, J.P.W.G; J.P.W.G.; HUSSEY,R.S.; GOMMERS, F.; BAKKER; SCHOTS, A. Secretory granule proteins from the subventral esophageal glands of the potato cyst nematode identified by monoclonal antibodies to a pretein fraction from second-stage juveniles. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v.9, p.39-46, 1996.

DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Early eventsin the activation of plant defense responses. **Annu. Rev. Phytopathol.**,v.32, 479 - 501, 1990.

DROPKIN, V. H.; NELSON, P.E. The histopathology of root-knot nematode infections in soybeans. **Phytopathology**, v. 50, p.442-447, 1960.

DROPKIN, V.H. Cellular responses of plants to nematode infections. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 7, p. 101-122, 1969.

EISENBACK, J.D.; TRIANTAPHYLLOU, H. H. Root-Knot nematode: *Meloidogyne* sp. and races. In: Nickle, W. R. ed. **Manual of agricultural nematology**. New York, 1991, p. 191-274.

ENDO, B.Y. Feeding plug formation in soybean roots infected with the soybean cyst nematode. **Phytopathology**, v.68, p.1022 – 1031, 1979.

FAGHIHI, J., VIERLING, R.A., HALBRENDT, J.M., FERRIS, V.R; FERRIS, J.M. Resistance genes in a “Williams 82” x “Hartwig” soybean cross to an inbred line of *Heterodera glycines*. **J. Nematol.**, v.27, p.418-421, 1995.

FASSULIOTIS, G. Resistance of *Cucumis* spp. to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita acrita*. **J. Nematol**, v. 2, p.174 – 178, 1970.

FASSULIOTIS, G. Plant breeding for root-knot nematode resistance. In: Lambert, F. and Taylor, C.E. (eds). **Root-Knot Nematodes (Meloidogyne species) Systematics, Biology and Control**. New York, 1979, Academic Press, p. 425 - 453.

FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTO, D.D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, p. 965 - 981, 1985.

FLEGG, J.J.M.. Extraction of *Xiphinema* and *Longidorus* species from soil by a modification of Cobb's decanting and sieving technique. **Ann. App. Biol.** 1967, v, 60, p.429-437.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annu. Rev. Phytopathol**, 1971, v. 9, p. 275-296.

FREITAS, S.F. **Mecanismos envolvidos nas ações antiúlceras (protetora gástrica) e antiácida do extrato da *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen.** Universidade do Paraná, Tese de Doutorado, 2002, 158p.

GOELDI, E.A. Relatório sobre a moléstia do cafeeiro na Província do Rio de Janeiro, 1887. Reeditado por Romero M. de Moura. Recife: UFRPE/ Fadurpe, 1988, 121p.

GOLDMAN, R.N.; NOVACKY, A.J. The hypersensitive reaction in plants to pathogens: A Resistance phenomenon .1994.

GIEBEL, J. Phenolic content in roots of some *Solanaceae* and its influence on IAA-oxidase activity as an indicator of resistance to *Heterodera rostochiensis*. **Nematologica** ,1970, v. 16, p.22-32.

GOLINOWSKI, W.; GRUNDLER, F.M.; W., SOBCZAK, M. Changes in structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*, Apud, **Plant Cell**, v.8, p. 1735-1745, 1996.

GRUNDLER, F. M .W.; SOBEZAK, M; LANGE, S..Defense responses of *Arabidopsis thaliana* during invasion and feeding site induction by the plant-parasitic nematode *Heterodera glycines*. **Physiol.Mol. Plant Pthol**, v. 50, p.419-429. 1997.

HARTMAN, K.M; SASSER, J.N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. In: BARKER, K.R., CARTER,C.C. AND SASSER.J.N. (eds) . **Advanced Treatise on Meloidogyne**, Vol.II, Methodology. North Carolina State University, Raleigh, 1985, pp. 69 -77.

HEATH, M.C. Reaction of nonsusceptibles to fungal pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.18, p. 211 – 236, 1980.

HOLUB, E.R.; BEYNON, J.L.; CRUTE, I.R. Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 7, p. 223-239. 1994.

HUANG C.L.; RHODE, R.A.. Phenol accumulation related to resistance in tomato to infection by root-knot and lesion nematodes. **J. Nematol**, v.5, 1973 p. 253 - 258.

HUANG, C.S. Formation, anatomy and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes. In: SASSER; C.C CARTER **An Advanced Treatise on *Meloidogyne***, v. 1, J.N., eds, (Raleigh: North Carolina State University Graphics), 1985, p. 155-164.

HUSSEY, R.S ; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 1025 - 1028, 1973.

HUSSEY, R.S. Disease-inducing secretions of plant-parasitic nematodes. **Annu. Rev. Phytopathol**, v.27, p.123- 141, 1989.

HUSSEY, R.S. Host-parasite relationships and associated physiological changes. In: SASSER, J.N.; CARTER, C.C. (eds) **An Advanced Treatise on *Meloidogyne***, Vol. I, Biology and Control, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, 1985, p. 143-153.

HUSSEY, R.S., DAVIS, E.L. AND RAY, C. *Meloidogyne* stylet secretions. In: LAMBERT, F.; DE GIORGI, C.; BIRD, D.M. (eds) **Advances in Molecular Plant Nematology**, New York, Plenum Press, 1994, p. 233-249.

KAPLAN, D.T. **Characterization of soybean incompatibility to *Meloidogyne incognita*** and its association to glyceollin accumulation in infected root tissue. Ph.D.diss. University of Carolina, Riverside 1978.

KATSUMI ATSUTSUGU; KATSUMI BUNICHI. **Patente JP 2002173414**, Skin care preparation. Publication: 2002-06- 1921

KLEMENT, Z., STALL; R.E., NOVACKY; A., ERSEK; T., FETT; W., HUANG; J., BECKMAN, C. Mechanisms of resistance. In: Z.KLEMENT,K.; RUDOLPH; SANDS D.C. eds. **Methods in Phytobacteriology**. Budapest: H. Stillman, p. 469 -473, 1990.

KORITSA, V.M.; ATKINSON, H.J. Proteinases of females of the phytoparasite (*Globodera pallida*) (potato cyst nematode). **Parasitology**, v. 109, p. 357-365, 1994.

KOSACK-HAMMOND.K.E ; JONES, D.G.J, Resistance Gene-dependent Plant Defense Responses. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1773-1791, 1996.

KREIKE, C.M.; DEKONING, J.R.A.; VINKE, J.H.; VAN OOIJEN, J.W.; STIEKEMA, W.J. Quantitatively-inherited resistance to *Globodera pallida* is dominated by one major locus in *Solanum spegazzinni*. **Theor. Appl. Genet.** v. 88, p.764-769, 1994.

MAGALHÃES, P.M., Agrotecnologia para o cultivo de *Pfaffia*. **Agrotecnologia das plantas medicinais**. CPQBA - UNICAMP 1998.

MAGALHAES, P.M.,. Propagação de algumas espécies do ginseng do Brasil. XIII. **Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**. Fortaleza, CE., p. 110. 1994

MAGGENTI, A. **General Nematology**.(New York: Springer-Verlag), 1981.

MARQUES, L.C. **Avaliação da ação adaptógena das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen - Amaranthaceae**. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Tese de Doutorado, 145p. 1998.

MASAKI NAOYA; SHIBUIA TAKASHI, FUKUDA YOSHIATSU, **Patente JP: 2002308795**, Antiallergy composition .Publication: 2002-10-1923.

MASCHIO, J. Japão provoca corrida da *Pfaffia* no Paraná. Folha de São Paulo. **Agrofolha, Caderno 5**, 21 de fevereiro de 1993.

MATTOS, J. K. A. **Biologia da ferrugem (*Uromyces plantensis* Speg.) da *Pfaffia glomerata* Pedersen.** – In: MING et al. **Plantas medicinais aromáticas e condimentares.** Avanços na Pesquisa agrônômica. p. 127-138, 1998.

MATTOS, J.K.A. Problemas nematológicos em plantas medicinais. **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Nematologia.** Maringá – Pr., 05 a 08 de outubro de 1998.

MC CLURE, M.A.; ELLIS, K.C. ; NIGH, E.L. Resistance of cotton to the root-knot nematode, *meloidogyne incognita*. **J. of Nematol**, v. 6, p.17-20, 1974.

MESQUITA, M.A.S., ALVES, R. B. N. VIEIRA, R.; OLIVEIRA, A.S. Mancha de Septoria em *Pfaffia glomerata* no Distrito Federal. **Fitop.Bras.**, v.28 (Suplemento), p 219, 2005.

MEYBECK, A.; BONTE, F.; REDZINIAK, G. **Use of an ecdysteroid in a cosmetic or dermatological composition or keratinocyte culture medium.**Int. Cl. A6K7/48 Fr.n. PI 94/04132. 20 AGOSTO 1993; 03 março 1994. Patent Application Paris, v. 92/10267, 28pp., 1994.

MILNE, D.L.; BOSHOFF, D. N; BUCHAN, P.W.W. The nature of resistance of *nicotiana repanda* to the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. **S. Afr. Agric. Sci** v. 8, p.557 - 567, 1965.

MONTANARI, JR., I.; MAGALHÃES, P.M.; QUEIROGA, C.L.; PEREIRA, B. Influences of plantation density and cultivation cycle in root productivity and tenors of β -ecdysone in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Abstrats. II World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare**, Mendoza, Argentina, nov., 10-15, (Org. ICMAP - ISHS - SAIPA) p.087, 1997.

NICHOLSON , R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 30,p. 369-389, 1992.

NIEBEL, A.; HEUNGENS, K.; BARTHELS, N.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; GHEYSEN, G. Plant-cyst nematode and plant-root-Knot nematode interactions **Parasitol. Today** , v.10, p. 424-430, 1994.

NISHIMOTO, N. The constituents of Brazilian Ginsengs Ann. **XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil** – Univ. do Paraná. Curitiba – PR. Abril de. p 167.,1992.

NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; TAKEMOTO, T.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F., AKISUE, M.K; HASHIMOTO, G. Ecdisteroides de *Pfaffia glomerata*. **Anais do XI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**. Univ. Fed. Paraíba – João Pessoa – PB 1990.

NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; FUGINO, M.; INOUE, S.; TAKEMOTO, T.; OLIVEIRA,F.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F., AKISUE, M.K; HASHIMOTO, G. TANAKA; O; ,R.,, H.KASAI; MATSUURA,H. Ecdsteriods from *Pfaffia iresinoids* and reassignment of some ¹³C NMR chemical shfits. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2505 - 2507, 1987.

OSBORN, A.E. Preformed antimicrobial coumponds and plant defense agains fungal attack. **Plant Cell** **8**, p.1821 – 1831, 1996.

PAPADOPOULOU,J; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Sex differentiation in *Meloidogyne incognita* and anatomical evidence of sex reversal. **J. Nemotol.**, v. 14, p. 549 – 566, 1982.

PAULSON, R.E.; WEBSTER, J.M. Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato, *Lycopersicon esculentum* L., to infection by the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Physiol.*, **Plant Pathol.** v.2, 227-234, 1972

PEGARD, A., BRIZZARD, G., FAZARI, A., SOUCAZE, O., ABAD, P.; CAPARALINO, C.D. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. **The American Phytopathological Society**, v.95, p.160-165, 2005.

RHODE, R.A. The expression of resistance in plants to nematode. **Ann. Rev. Phytopathology** v. 10, p.233-252, 1972.

RICE, S.L.; STONE, A.R.; LEADBEATER, B.S.C. Changes in cell structure in roots of resistant potatoes parasitized by potato cyst nematodes. 2. Potatoes with resistance from *Solanum vernei*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v.31, p. 1-14, 1987.

ROBERTS, P.A. Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. **Ann. Rev. of Phytopathology**, v. 33, p. 199-221, 1995.

ROBERTS, P.A. Current status of the availability, development, and use of host plant resistance to nematodes. 1992. **J. Nematol.**, v.24, p.213-227, 1992.

ROBERTS, P.A. **Plant resistance in nematode pest management. J. Nematol.**, v.14, p. 24-33, 1982.

ROBERTS, P.A. **Concepts and Consequences of Resistance.** International Plant Resistance to Parasitic Nematodes, Wallingford:, CAB International, 2002 , p.23-41.

ROBERTS, P.A.; MATTHEWA, W.C. ; VEREMIS, J.C. Genetic mechanisms of the host plant resistance to nematodes. In: Barker, K.R., Pederson, G.A. and Windham, G.L. (eds) **Plant-Nematode Interactions.** American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, p. 209-238, 1998.

ROSA, M. C. Processo de ocupação e situação atual. In: VAZZOLER, A.E.A.M., AGOSTINHO, A.A., HAHN, N.S., (Eds.) **A planície de inundação do alto Paraná**. Maringá: EDUEM, 1997 p. 371 - 394.

RYALS, J.A.; NEUENSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H.Y; HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v. 8, p.1809-1819, 1996.

SASSER, J.N.; FRECKMAN, D.W. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J.A. and DICKSON, D.W. (eds). **Vistas on Nematology**. Society of Nematologists, Hyattsville, Maryland, 1987 p. 7-14.

SASSER, J.N. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. **Plant Disease**, v. 64, 36 – 41, 1980.

SHEPHERD, R.L. Breeding root-knot resistant *Gossypium hirsutum* L. using a resistant wild *G. barbadense* L. **Crop Sci.**, v.14, p. 687-691, 1974a.

SHEPHERD, R.L. Transgressive segregation for root-knot nematode resistance in cotton. **Crop Sci** v. 14, p. 872-875. , 1974b.

SHIOBARA, Y., INOUE, S., NISHIGUCHI, Y., TAKEMOTO, T., NISHIMOTO, N., OLIVEIRA, F., AKISUE, G., Iresinoide, a yellow pigment from *Pfaffia iresinoides*, **Phytochemistry**, v. 31, p. 953-956, 1992.

SILLERO, J.C.; RUBIALES, D. Histological characterization of resistance to *Uromyces viviae-fabae* in faba bean. **Phytopathology** v. 92, p. 294-299, 2002.

SIQUEIRA J. C. In: Rizzo J.A. (Coord.) **A Flora do estado de Goiás**. Goiânia Coleção Rizzo, v. 12, 1989, 44p.

SIQUEIRA, J.C., Considerações taxonômicas sobre as espécies brasileiras do gênero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae). **Acta Biológica Leopoldinense**, São Leopoldo, v. 10, p. 269 - 278, 1998.

SMITH, P.G. Embryo culture of a tomato species hybrid. Proceedings of **American Horticultural Science**, v. 44, p.416-431, 1944.

TANDA, A.S., ATWAL,A.S.; BAJAJ, Y.P.S. In vitro inhibition of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by Sesame root-exsudate and its amino acids. **Nematologica**, v.35, p.115-124,1989.

TAYLOR , A. L. ; J.N. SASSER. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne species*)**.North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, 1983,p. 111.

TIHOHOD, D., **Nematologia Agrícola Aplicada**. Jaboticabal: FUNEP , 1993, 372p.

TRIANAPHYLLOU, A.C. Environmental sex differentiation of nematodes in relation to pest management. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.11, p. 441-462, 1973.

TRIANAPHYLLOU, A.C. Genetics of nematode parasitism on plants.In: VEECH, J.A. and DICKSON, D.W. (eds). **Vistas on Nematology**. Hyattsville, Maryland Society of Nematologists, 1987 p. 354-363.

TRUDGILL, D.L. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. **Annual Review of Phytopathology** v. 29, p. 167-192, 1991.

VALETTE, C., ANDARY, C., GEIGER, J. P., SARAH, J. L. , NICOLE, M. Histochemical and Cytochemical investigations of phenols in roots of banana infected by the burrowing nematode *Radopholus similis*. **Phytopatology** v. 88, p. 1141-1148,1998.

VANDERPLANK, J.E. **Genetic and Molecular Basis of Plant Pathogenesis.**, Berlin: Springer Vellag 1978.

VIEIRA, R. F.; SILVA, S. R.; NEVES R.B.; SILVA; D.B., DIAS, T. A. B., UDRY, M.C.F.V., WETZEL, M., MARTINS, R.C. **I Reunião Técnica sobre**

Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas: Estratégias para Conservação e Manejo Sustentável. Brasília, DF: Embrapa / Ibama / CNPq, 2002. v. 1, 200 p.

von MENDE, N. Invasion and migration behaviour of sedentary nematodes. In: Fenoll C., GRUNDLER FMW, OHL SA, eds. **Cellular and Molecular Aspects of Plant-nematode Interactions.** Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997 p. 51-64.

WALLACE, H.R. **Nematode ecology and plant disease.** New York: Crane, Russak & Co., , p.228,1973.

WANG, M.; GOLDMAN, I.L. Resistance to root - knot nematodes (*Meloidogyne hapla* Chitwood) in carrot is controlled by two recessive genes. **J. of Her.** v. 87, p. 119 - 123, 1996.

WEBBE, D.M.; BALTAZAR, B.; RAO-ARELLI, A. P.; SCHUPP, J.; CLAYTON, K.; KEIN, P.; BEAVIS, W. D., Genetic mapping of soybean cyst nematode race 3 resistance loci in the soybean PI 437.654. **Theor. Appl. Genet.**, v.91, p. 574 - 581, 1995.

WEBBER, H.J.,ORTON, W.A. **Some diseases of cowpea. II. A cowpea resistant to root knot (*Heterodera radicum*).** Bulletin no.17, US Department of Agriculture, Bureau of Plant Industry, Washington, DC.1902.

WILLIAMSON V.M., Root-knot resistance genes in tomato and their potential for future use. **Ann. Rev. of Phytopathology**, v. 36, p. 277 - 293.

WILLIAMSON V.M., GLEASON, C.A. Plant-nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology** v. 6, p. 327-332, 2003.

WILLIAMSON, V.M., and Hussey, S.R. Nematode Pathogenesis and Resistance in Plants. **Plant Cell**, v. 8, p. 1735-1745, 1996.

