

**ANA CLAUDIA FERREIRA DA CRUZ**

**INTERAÇÕES ENTRE ACESSOS DE FÁFIA [*Pfaffia glomerata*  
(Spreng.) PEDERSEN] COM NEMATOIDES (*Meloidogyne incognita*  
e *M. javanica*): ASPECTOS FITOQUÍMICOS E ESTRUTURAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Botânica  
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

C957i  
2011

Cruz, Ana Cláudia Ferreira da, 1972-  
Interações entre acessos de fáfia [*Pfaffia glomerata*  
(Spreng.) Pederson] com nematoides (*Meloidogyne incognita*  
e *M. Javanica*): aspectos fitoquímicos e estruturais / Ana  
Cláudia Ferreira da Cruz. – Viçosa, MG, 2011.  
xi, 86f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Pfaffia glomerata*. 2. *Meloidogyne*. 3. Nematoda.  
4. Enzimas. 5. Beta-ecdisona. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 583.53

ANA CLAUDIA FERREIRA DA CRUZ

**INTERAÇÕES ENTRE ACESSOS DE FÁFIA [*Pfaffia glomerata*  
(Spreng.) PEDERSEN] COM NEMATOIDES (*Meloidogyne incognita*  
e *M. javanica*): ASPECTOS FITOQUÍMICOS E ESTRUTURAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Botânica  
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

APROVADA: 28 de fevereiro de 2011.

---

Prof<sup>ª</sup>. Maria Cristina Baracat Pereira  
(Co-orientadora)

---

Prof. Leandro Grassi de Freitas  
(Co-orientador)

---

Dr. Leonardo Lucas Carnevalli Dias

---

Prof. Eliseu José Guedes Pereira

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Orientador)

Aos meus amados pais Alahyr e Diva (*in memoriam*)

Ao meu sogro Néri Gomide (*in memoriam*) e à minha sogra Maria Cornélia

Ao meu marido, companheiro de todos os momentos, Antônio de Pádua (Patch)

Aos meus amados filhos Gabriela (Bibi) e Marcelo Augusto (a caminho)

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela Vida.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Botânica, pela oportunidade concedida para a realização do curso.

Ao Departamento de Biologia Vegetal, ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), ao Laboratório de Anatomia Vegetal, ao Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides e ao Laboratório de Proteômica, pelo apoio e suporte na condução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo durante o curso de doutorado.

Aos professores do Departamento de Biologia Vegetal, pela amizade e conhecimentos proporcionados.

Aos professores Marília Contin Ventrella e Edgard Augusto de Toledo Picoli, pelas sugestões e esclarecimentos durante a realização do trabalho.

Aos amigos do LCT II, Cléber, Diego, Anne, Marcos, Leandro, Poliana, Joyce, Elyabe, Virgílio, Lorena, Joseila, Marcela, Denise e Lili, pela agradável convivência durante a realização do trabalho, pelo tempo dedicado por TODOS em meu auxílio e pelos ensinamentos e conselhos dispensados a cada dia.

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides, em especial à Érica, Guilherme, Zé Ricardo e Ronaldinho, pelos constantes auxílios e convivência.

À Ana Ermelinda, uma gratidão especial pelos ensinamentos e paciência dispensados a todos do LCT II, principalmente comigo.

À Kida, pelas orientações estatísticas, e pela amizade.

Ao Seu Mário e Dona Neusa, responsáveis pelo Viveiro do Café, pela amizade formada e auxílio.

À Virgínia, pela convivência, auxílio no HPLC e sugestões, muito obrigada.

Ao professor e amigo Wagner Campos Otoni, há quem muito admiro pela competência profissional, pela oportunidade concedida para a realização

deste curso, pela constante orientação, paciência, incentivo e, acima de tudo, pelo agradável convívio.

Aos meus co-orientadores Leandro e Cristina, pelo constante auxílio e amizade.

Aos professores integrantes da banca examinadora, por se disponibilizarem em constante apoio e sugestões.

Ao Ângelo, o anjo da Botânica, e à Francine, pela amizade e incansável suporte.

Aos meus pais e irmãos, que sempre me incentivaram na obtenção de novas conquistas.

Ao meu parceiro e amigo Patch, pela paciência, compreensão e apoio durante as ausências tão necessárias.

À minha amada filhinha Bibi, por tentar entender a importância dos meus estudos, apesar de sua tão pouca idade, e ainda, ao Marcelo Augusto que está a caminho com nosso amor.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, fazendo parte desta etapa de vida, e que por “negação do consciente”, não tenham sido aqui citados (as).

## BIOGRAFIA

Ana Claudia Ferreira da Cruz, filha de Alahyr Ferreira da Cruz e Diva Gemma Pigioni da Cruz, nasceu em 05 de janeiro de 1972, em São Paulo, SP.

Em 1992, concluiu o Curso Técnico em Administração no Colégio São José de Vila Zelina, em São Paulo, SP.

Em 2002 e 2003 foi bolsista do Programa Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D-Café, em que esteve vinculada ao subprojeto “Embriogênese somática indireta via cultura líquida em genótipos de *Coffea arabica* e de *Coffea canephora*”.

Em 2003, diplomou-se no curso de Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa.

Em 2004 até fevereiro de 2005 atuou como bolsista do Programa Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, ao qual se encontrava vinculada ao subprojeto “Embriogênese somática indireta em explantes foliares de híbrido F1 expressando características agronômicas desejáveis”.

Em março de 2005, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Botânica, como mestranda, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2007.

Em março de 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Botânica, como doutoranda, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2011.

## ÍNDICE

<b>RESUMO.....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>16</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO I: Utilização do sistema radicular bipartido como ferramenta no estudo da interação entre acessos de fáfia [<i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen] e <i>Meloidogyne incognita</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>2.- METODOLOGIA .....</b>	<b>24</b>
2.1 - Material Vegetal.....	24
2.2 - Inoculação de <i>Meloidogyne incognita</i> em raízes bipartidas.....	24
2.3 - Análises químicas.....	26
2.4 - Determinações de galhas e ovos.....	27
2.5 - Análise estrutural e histoquímica .....	27
2.6 - Detecções das atividades das enzimas indicadoras do estado de indução a resistência de plantas .....	28
2.7 - Determinações da concentração de proteínas totais .....	28
2.8 - Detecções da atividade de Peroxidases (POD) .....	28
2.9 - Detecções de Fenilalanina Amônia-liase (PAL) .....	29
2.10 - Atividades de Quitinases.....	29
2.11 - Atividades de $\beta$ -1,3-glucanases.....	31
2.12 - Análise estatística.....	31
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
3.1. - Análise Química .....	32
3.2 - Determinação de galhas, ovos, massa seca e perda de água .....	32
3.3 - Análise estrutural e histoquímica .....	36
3.4 - Detecções das atividades das proteínas totais e das enzimas indicadoras do estado de indução a resistência de plantas .....	39
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>

CAPÍTULO II: Interação entre acessos de fáfia [ <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen] e <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>M. Javanica</i> .....	55
<b>1.- INTRODUÇÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>2.- METODOLOGIA</b> .....	<b>57</b>
2.1 - Material Vegetal.....	57
2.2 - Inoculação de <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>M. javanica</i> .....	57
2.3 - Análises químicas.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b> 60
2.4 - Determinações de galhas e ovos.....	59
2.5 - Análise estrutural e histoquímica .....	60
2.6 - Detecções da atividade das enzimas indicadoras do estado de indução a resistência de plantas .....	60
2.7 - Determinações da concentração de proteínas totais.....	61
2.8 - Detecções da atividade de Lipoxigenases (LOX) .....	61
2.9 - Detecções da atividade de Peroxidases (POD) .....	63
2.10 - Detecções de Fenilalanina Amônia-liase (PAL).....	63
2.11 - Atividades de Quitinases.....	64
2.12 - Atividades de $\beta$ -1,3-glucanases.....	63
2.13. - Análise estatística.....	65
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>66</b>
3.1 - Análises químicas.....	66
3.2 - Determinações de galhas, ovos, massa seca e perda de água.....	66
3.3 - Análise estrutural e histoquímica .....	689
3.4 - Detecções das atividades das proteínas totais e das enzimas indicadoras do estado de indução a resistência de plantas .....	72
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>74</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>79</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>85</b>

## RESUMO

CRUZ, Ana Claudia Ferreira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Interações entre acessos de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] com nematoides (*Meloidogyne incognita* e *M. javanica*): aspectos fitoquímicos e estruturais.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Co-orientadores: Leandro Grassi de Freitas e Maria Cristina Baracat Pereira.

O gênero *Pfaffia*, pertencente à família Amaranthaceae, contém ecdisteroides em teores consideráveis. Dentre as espécies, encontra-se *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, cuja determinação do teor de  $\beta$ -ecdisona (20E), ecdisteroide de interesse, vem sendo realizada principalmente nas raízes. Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador desta planta, porém existem fatores fitossanitários limitantes que podem prejudicar seu cultivo. Entre as doenças que afetam o sistema radicular, destacam-se as provocadas por nematoides do gênero *Meloidogyne*, que causam galhas e apodrecimento nas raízes. Entretanto, a presença desses nematoides estimulou o aumento no teor de 20E em diferentes acessos de *Pfaffia*, o que está correlacionado à possível interação positiva existente entre o desenvolvimento do nematoide e a produção do princípio ativo na planta, pois 20E é análogo aos hormônios envolvidos na ecdise. Dessa forma, foram utilizadas plantas de *P. glomerata* [acessos 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)], propagadas *in vitro*, e com 30 dias de cultivo pós aclimatização. Contudo, para haver ausência de efeitos tóxicos do agente indutor (nematoide) sobre a planta hospedeira (fáfia), adotou-se a técnica de sistema radicular bipartido, onde foi adicionado em um vaso as concentrações de 0, 6.000, 12.000, 18.000, 24.000 e 30.000 ovos de nematoide *M. incognita* gerando, então, os tratamentos com e sem ovos de nematoide. Verificou-se a comunicação sistêmica entre as raízes, o acúmulo do teor do princípio ativo (20E), além de determinar-se a tolerância de ambos os acessos ao nematoide *M. incognita* e a atividade das enzimas indicadoras do estado de indução à resistência de plantas. Realizou-se, ainda, a análise de interação dos acessos AC 22 e AC 43 com a infecção por *Meloidogyne incognita* e por *M. javanica*, na qual abrangeu os aspectos fitoquímicos, anatômicos e histoquímicos. Para isso foram utilizadas três combinações de plantas em mesmo vaso (22/22; 43/43 ou 22/43). Foi observado haver interferência, como a competição entre os acessos de fáfia, em que a presença do nematoide influenciou a produção de 20E. Essa competição entre acessos promoveu menor tolerância dos mesmos aos nematoides *M. incognita* e *M. javanica*. Análises anatômicas demonstraram que, principalmente no AC 22 infectado por

*Meloidogyne*, o cilindro vascular das raízes apresentou número elevado de células gigantes, multinucleadas, com citoplasma denso, bem como compressão de células do córtex e do cilindro vascular devido à presença dos sítios de alimentação. Esses sítios resultaram na compressão dos elementos do xilema nos dois acessos avaliados, ainda que o AC 43 tenha apresentado menor número de células gigantes ao longo do sistema radicular em comparação ao AC 22. Esses dados foram confirmados também nas análises de número de galhas e ovos dos nematoides. Os testes histoquímicos realizados indicaram reação positiva, da planta atacada pelo nematoide, tendo as plantas do tratamento testemunha menor intensidade de coloração para os corantes PAS, Sudan e xylidine Ponceau. A produção das enzimas indicadoras do estado de indução à resistência de plantas, com a combinação dos acessos e a presença do nematoide inoculado em cada vaso, demonstrou haver desativação parcial da via de controle oxidativo, bem como da via de síntese constitutiva de compostos fenólicos e de quitinases.

## ABSTRACT

CRUZ, Ana Claudia Ferreira of the, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2011. **Interaction between *Pfaffia* accessions [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] with nematodes (*Meloidogyne incognita* and *M. javanica*): aspects phytoquimics and structural.** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-advisers: Leandro Grassi de Freitas and Maria Cristina Baracat Pereira.

Species of the genus *Pfaffia*, belonging to the family Amaranthaceae, contains significant levels of ecdysteroids. In *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, the determination of  $\beta$ -ecdysone (20E), ecdysteroid of interest, has been carried out mainly in the roots. Brazil is currently the largest producer and exporter of this species, but there are limiting factors that affect plant growth and crop production. Nematodes of the genus *Meloidogyne* are among the main diseases of the root system, causing galls and rot of the root system. However, the presence of these nematodes has increased the amount of 20E in different accessions of *Pfaffia*, which is correlated to the possible positive interaction between nematode development and production of the active ingredient in the plant, since 20E is similar to the hormones involved in ecdysis. Thus, this study evaluated two accessions of *P. glomerata* [2202-15 (AC 22) and 2209-09 (AC 43)] propagated *in vitro* and at 30 days of cultivation after acclimatization, in interaction with *Meloidogyne*. The split-root system technique was used to avoid the toxic effects of the inducing agent (nematode) on the host plants (*Pfaffia*), with concentrations of 0, 6000, 12000, 18000, 24000 and 30000 *M. Incognita* eggs inoculated into the containers, characterizing the treatments with and without nematode eggs. The study evaluated the systemic communication between roots, the accumulation of the active ingredient (20E) and determined the tolerance of both accessions to the nematode *M. incognita* and the activity of enzymes indicative of the induction of plant resistance. Phytochemical, anatomical and histochemical aspects of the interaction of the accesses AC 22 and AC 43 infected by *Meloidogyne incognita* and *M. Javanica* were also analyzed. For this purpose, three plant combinations were grown in the same container (22/22, 43/43 or 22/43). Interference was observed, such as competition between *Pfaffia* accessions, in which the presence of nematode influenced 20E production. This competition led to less tolerance of the accesses to the nematodes *M. incognita* and *M. javanica*. Anatomical analysis showed that *Meloidogyne* infected root vascular cylinders, particularly in AC 22, had a high number of giant, multinucleated, densely cytoplasmic cells, and compression of cortical cells and vascular cylinder

caused by the feeding sites. These sites compressed the xylem elements in the two accessions, although AC 43 had less giant cells along the root system compared with AC 22. These data were also confirmed by the analysis of number of galls and eggs. The histochemical tests showed positive reaction of plants attacked by the nematodes, whereas the control plants showed less intense staining with the dyes PAS, Sudan and xylidine Ponceau. The production of enzymes indicative of the induction of plant resistance, in combination with the accessions and nematode eggs inoculated into each container, showed that there was partial deactivation of the control of the oxidative pathway, as well as of the constitutive synthesis of phenolic compounds and chitinases.

## INTRODUÇÃO GERAL

*Pfaffia* pertence à família Amaranthaceae, que possui distribuição cosmopolita (Souza & Lorenzi, 2005). O Brasil é o mais importante centro de coleta de espécies desse gênero para fins medicinais e alimentícios (Martins & Nicoloso, 2004; Corrêa Júnior et al., 2006), sendo conhecidas principalmente como ginseng-brasileiro e fáfia, também denominada popularmente paratudo, corango (Oliveira, 1986), corrente, sempre-viva, batata-do-mato e, no mercado internacional, suma (Corrêa Júnior et al., 2006 a, b).

A fáfia tem grande potencial para consumo no mercado interno e, também, para exportação (Nascimento et al., 2007), principalmente para os Estados Unidos e Japão, sendo que o mercado brasileiro absorve quase toda a sua produção, não se comercializando mais por falta de matéria-prima (Montanari Jr., 2001). Outra característica importante está relacionada ao período de cultivo, visto que o ginseng coreano demora de cinco a sete anos para ser colhido, enquanto a *Pfaffia* leva dois anos (Vallejo, 2007).

Utilizada há séculos pelos índios brasileiros na cura e prevenção de doenças, *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen teve suas propriedades medicinais comprovadas cientificamente ao ser analisada pelo laboratório “Rhoto Pharmaceutical Co Ltda”, no Japão (Ming & Corrêa Júnior, 2004; Corrêa Júnior et al., 2006 a, b). Contudo, devido à grande demanda atual de ginseng-brasileiro para a produção de medicamentos, buscam-se alternativas para a produção de matéria-prima homogênea e de qualidade (Flores et al., 2006; Flores et al., 2010).

Nesse contexto, o cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais constitui uma alternativa promissora para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal, com elevada qualidade fitossanitária. Trabalhos visando ao estabelecimento de protocolos para propagação *in vitro* da espécie foram iniciados por Nicoloso et al. (2001), desde então outros trabalhos tem sido desenvolvidos buscando maximizar o processo de propagação (Nicoloso & Erig, 2002; Nicoloso et al., 2003; Russowski & Nicoloso, 2003; Kagiki et al., 2004; Skrebsky et al., 2004; Flores et al., 2006; Kamada, 2006; Maldaner et al., 2006; Flores et al., 2007; Festucci-Buselli, 2008; Iarema, 2008, Nicoloso et al., 2008; Festucci-Buselli et al., 2008a, b; Flores et al., 2010).

A propagação clonal, alicerçada em técnicas de cultura *in vitro*, pode refletir positivamente no melhoramento genético, com ganhos efetivos decorrentes da fixação

de genótipos com elevado teor do princípio ativo  $\beta$ -ecdisona (20E). Nesse contexto Kamada (2006) determinou características morfológicas, químicas e moleculares de um banco de germoplasma de *P. glomerata*, que possibilitou a seleção de acessos superiores na produção de 20E. Posteriormente, Iarema (2008), utilizando dois desses acessos, verificou maior concentração do princípio ativo na presença de nematoides, resultados também observados em *P. paniculata* por Carneiro et al. (2007). Tal fato pode estar correlacionado à 20E, o qual é um análogo dos hormônios envolvidos na ecdise (Dinan, 2001; Festucci-Buselli et al., 2008a, b). No entanto, acessos de *Pfaffia glomerata* apresentaram diferentes níveis de resistência e suscetibilidade quanto ao nematoide de galhas, *Meloidogyne incognita* (Gomes, 2006) e *Meloidogyne javanica* (Carneiro et al., 2007), demonstrando haver acentuada variabilidade para a resistência.

O grande número de hospedeiros existentes e a interação com outros organismos patogênicos colocam os nematoides entre os principais patógenos responsáveis pela limitação da produtividade agrícola (Ritzinger et al., 2007). Entretanto, o aumento na concentração de 20E, produto de grande interesse industrial, nos conduz a avaliar a existência de uma relação entre a produção e os danos causados no sistema radicular da espécie. Tendo em vista que os nematoides parasitam as raízes de *Pfaffia*, sede da extração da substância utilizada na produção de fármacos (Gomes, 2006), há necessidade de avaliar acessos dessa planta quanto à resistência ao nematoide de galhas, de forma a embasar estratégias para compreender possíveis mecanismos de ação alelopática durante seu desenvolvimento.

Pesquisas alelopáticas podem ser consideradas como componente fundamental na investigação nematológica, uma vez que a liberação dos compostos aleloquímicos pelas raízes está relacionada com o comportamento dos nematoides, sendo esse de atração ou repulsão (Halbrendt, 1996). Entretanto, a alelopatia e a competição ocorrem simultaneamente, tornando-se difícil separar esses mecanismos de interferência em nível de campo (Inderjit & Del Moral, 1997).

A interferência entre plantas pode ser basicamente de duas naturezas: a competição e a alelopatia, esse último sendo de fatores químicos produzidos por outro indivíduo. A interferência por competição consiste na competição entre plantas e a influência de fatores ambientais como luz, água, temperatura, vento, pH e disponibilidade de nutrientes, ou ainda pela interação entre ambos (Ferreira & Borghetti, 2004). O metabolismo de defesa de uma planta pode se modificar pela presença de plantas vizinhas, com o acúmulo de metabólitos secundários (Broz et al.,

2010). Em *Pfaffia* ainda não existem relatos que façam inferência deste efeito no acúmulo de 20E.

Nematoides tem interações complexas com suas plantas hospedeiras, resultando, via de regra, em mudanças morfológicas e de desenvolvimento em ambos os organismos (Williamson & Hussey, 1996). No parasitismo de nematoides do gênero *Meloidogyne*, células estimuladas por nematoides tornam-se gigantes e exibem generalizado aumento da atividade enzimática, comparado às células adjacentes não-estimuladas (Gommers & Dropkin, 1977). As células gigantes contêm mais proteínas, aminoácidos e ácidos nucléicos do que células normais (Bird, 1961).

O metabolismo secundário das plantas manifesta-se em células e tecidos específicos, em determinados estádios do seu crescimento, sugerindo íntima correlação entre crescimento e diferenciação morfológica das células (Rocha & Campo, 2004). E o acúmulo de compostos eletrodensos nas células parenquimáticas corticais e vasculares sugere que os fenólicos podem estar envolvidos na defesa das plantas ao ataque de nematoides (Valette et al., 1998).

Enzimas podem interagir com reguladores de crescimento e fenóis, resultando na expressão de suscetibilidade ou resistência (Premachandran & Dasgupta, 1983), como fenilalanina amônia liase, lipoxigenases, peroxidases, quitinases e as  $\beta$ -1-3-glucanases, consideradas enzimas indicadoras do estado de indução a resistência de plantas.

O aumento da atividade de fenilalanina amônia liase (PAL) na resistência de plantas a nematoides foi relatado por Arfaoui et al. (2007) e Jaiti et al. (2007). Os compostos fenólicos apresentam diversas funções nos vegetais e a classe mais abundante é a derivada da fenilalanina. A PAL, enzima-chave na rota dos fenilpropanoides, está relacionada com mecanismos de defesa contra patógenos, e é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia. O ácido *trans*-cinâmico é, por sua vez, incorporado em diferentes compostos fenólicos, dando origem a fitoalexinas, compostos antimicrobianos intimamente associados à resistência de plantas a patógenos (Wuyts et al., 2006; Arfaoui et al., 2007).

As lipoxigenases (LOX) vegetais utilizam o ácido linolênico (C18:3) ou o linoleico (C18:2) como substrato e estão associadas a importantes processos fisiológicos, tais como: biossíntese de compostos regulatórios, crescimento e desenvolvimento, senescência, germinação de sementes, resposta a ferimento, proteína de reserva vegetativa e resistência a insetos e patógenos. Quando os tecidos da planta

são danificados por patógenos ou mecanicamente, ocorre uma degradação sequencial de lipídios, cujos produtos iniciais são os hidroperóxidos resultantes da ação das lipoxigenases (Silva et al., 2001).

As peroxidases (PO) são importantes componentes de resposta a estresses em plantas, ocorrendo um aumento na sua expressão quando infectadas por nematoides (Ibrahim, 1991).

As quitinases e as  $\beta$ -1-3-glucanases constituem um grupo de enzimas hidrolíticas, desempenham diversas funções no crescimento e desenvolvimento das plantas, e são drasticamente induzidas quando as plantas respondem a processos de ferimentos, infecção por fungos, bactérias ou vírus patogênicos, catalisando reações de quitina (Antunes, 2008).

Dessa forma, esse trabalho tem como objetivos: i) analisar a interação dos acessos 2202-15 e 2209-09 de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] com *Meloidogyne incognita*, verificando-se a eficiência de diferentes concentrações de inóculo na produção de  $\beta$ -ecdisona, por meio do uso do sistema radicular bipartido; ii) avaliar os acessos de *P. glomerata* quanto à suscetibilidade ou resistência aos nematoides de galhas, e, iii) analisar a interação dos acessos 2202-15 e 2209-09 de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] com *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, caracterizando a interferência e abrangendo aspectos fitoquímicos, anatômicos e histoquímicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, P. W. P. **Proteômica e peptidômica aplicadas ao estudo da defesa de plantas de tomate à injúria mecânica.** (Dissertação em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, MG. 119p, 2008.
- ARFAOUI, A.; EL HADRAMI, A.; MABROUK, Y.; SIFI, B.; BOUDABOUS, A.; EL HADRAMI, I.; DAAYF, F.; CHÉRIF, M. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45:470-479, 2007.
- BIRD, A. The ultrastructure and histochemistry of a nematode-induced giant cell. **The Journal of Biophysical and Biocitochemical Cytology**, 11:701-715, 1961.
- BROZ, A.K.; BROECKLING, C. D.; DE-LA-PEÑA, C.; LEWIS, M. R.; GREENE, E. G.; CALLAWAY, R. M.; SUMNER, L. W.; VIVANCO, J. M. Plant neighbor identity influences plant biochemistry and physiology related to defense. **BMC Plant Biology**, 10:115, 2010.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; MESQUITA, L.F.G.; CIROTTO, P.A.S.; PEREIRA, S.I.V.; PEREIRA, P.S.; SILVA, D.B.; VIEIRA, R.F. Detecção de *Meloidogyne* spp. em *Pfaffia* spp. no Distrito Federal e patogenicidade de *M. javanica* a *Pfaffia glomerata* e *P. paniculata*. **Nematologia Brasileira**, 30:159-163, 2007.
- CORRÊA JÚNIOR., C.; CORTEZ, D.A.G.; MING, L.C.; SOARES, W. **Fáfia – O ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen): Aspectos agronômicos e fitoquímicos.** Curitiba: Clichetec, 22p, 2006a.
- CORRÊA JÚNIOR., C.; MING, L.C. Fáfia, ginseng brasileiro. In: LÓPEZ, C.; SHANLEY, P.; CRONKLETON. (ORG.). **Riquezas del bosque: frutas, remedios y artesanías en América Latina.** Santa Cruz: Centro para la investigación forestal internacional, p.82-86, 2006b. Disponível em: [www.cifor.cgiar.org/publications](http://www.cifor.cgiar.org/publications), Acesso em: 10/06/2009.
- DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry** 57:325-339, 2001.
- FERREIRA, A. G., BORGHETTI, F. [Organizadores]. **Germinação: do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed, 323 p., 2004.
- FESTUCCI-BUSELLI, R.A. **Accumulation pattern of the phytoecdysteroid 20-hydroxyecdysone in different organs of *Pfaffia glomerata*.** (Doutorado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, MG. 83p, 2008.
- FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; OTONI, W.C. Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone – a review. **Botany**, 86: 978-987, 2008a.

- FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; VIEIRA, R.F.; OTONI, W.C. Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 20: 305-307, 2008b.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; VASCONCELLOS, N.J.S. Indução de calos e aspectos morfogenéticos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8:89-95, 2006.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J. Propagação clonal rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken utilizando thidiazuron. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 9:1-7, 2007.
- FLORES, R.; BRONDANI JR, D.; CEZAROTTO Jr, V.; GIACOMELLI, S. R.; NICOLOSO, F. T. Micropropagation and  $\beta$ -ecdysone content of the Brazilian ginsengs *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 46:210-217, 2010.
- GOMES, A.C.M.M. **Resistência e caracterização histológica de acessos de *Pfaffia glomerata* a *Meloidogyne incognita***. (Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 73 p., 2006.
- GOMMERS, F.J.; DROPKIN, V.H. Quantitative histochemistry of nematode-induced transfer cells. **Phytopathology**, 67: 869-873, 1977.
- HALBRENDT, J.M. Allelopathy in the management of plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, 28:8-14, 1996.
- IAREMA, L. **Enxertia e propagação *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. (Tese de Doutorado Botânica) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 191p., 2008.
- IBRAHIM, S. K. Peroxidase isoenzymes from *Meloidogyne* spp. cultured on different hosts. **Revue Nématologie**, 14:335-344, 1991.
- INDERJIT; DEL MORAL, R.. Is separating resource competition from allelopathy realistic? **The Botanical Review**, 63: 221-230, 1997.
- JAITI, F. MEDDICH, A.; EL HADRAMI, I. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against bayoud disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 71:166–173, 2007.
- KAGIKI, F.O.; GONÇALVES, G.C.; OLIVEIRA, E.T.; CROCOMO, O.J.; GALLO, L.A. Indução de calos e produção de saponinas totais em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 7:43-50, 2004.

- KAMADA, T. **Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] por RAPD, caracteres morfológicos e teor de  $\beta$ -ecdisona.** (Tese de Doutorado Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 106p., 2006.
- MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, E.S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E.C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, 36:1201-1206, 2006.
- MARTINS, C.F.; NICOLOSO, F.T. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 6:53-61, 2004.
- MING, L.C.; CORRÊA JÚNIOR, C. Evaluation of the development of fáfia - *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta Horticulturae**, 629:273-275, 2004.
- MONTANARI JÚNIOR, I.M. 2001. Aspectos do cultivo comercial de plantas medicinais nativas. *Agroecologia*, Fevereiro-Março, p.11.
- NASCIMENTO, E.X.; MOTA, J.H.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. Produção de biomassa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Plantago major* L. em cultivo solteiro e consorciado. **Ciência e Agrotecnologia**, 31:724-730, 2007.
- NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; MARTINS, C.F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 3:11-18, 2001.
- NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C. Efeito de tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Edição Especial, 1499-1506, 2002.
- NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, 27:84-90, 2003.
- NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E.; CASTRO, G.Y. pH do meio de cultivo e crescimento de plântulas de ginseng brasileiro cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, 38: 2059-2062, 2008.
- OLIVEIRA, F. *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze - O ginseng brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 1:86-92, 1986.
- PREMACHANDRAN, D.; DASGUPTA, D.R. A theoretical model for plant-nematode interaction. **Revue Nématologie**, 6: 311-314, 1983.
- RITZINGER, C.H.S.P.; BORGES, A.L.; LEDO, C.A.S.; CALDAS, R.C. Fitonematoides associados a bananais 'pacovan' sob condição de cultivo irrigado: relação com a produção. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 29:677-680, 2007.

ROCHA, F.S.; CAMPOS, V.P. Efeito de exsudatos de cultura de células de plantas em juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, 29, 2004.

RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F.T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, 33:57-63, 2003.

SILVA, M.D.; OLIVEIRA, M.G.A.; LANNA, C.; PIRES, C.V.; PIOVESAN, N.D.; JOSÉ, I.C.; BATISTA, R.B.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a *Diaphorte phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, agente causal do cancro-da-haste. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 13: 316-328, 2001.

SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Ciência Rural**, 34:1471-1477, 2004.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, p:220-223, 2005.

VALLEJO, S. 2007. Cultivo de ginseng. Resposta Técnica. Disponível em: [www.sbrt.ibict.br](http://www.sbrt.ibict.br). Finalização em 14/07/2009.

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*. **Phytopathology**, 88:110, 1998.

WILLIAMSON, V.M.; HUSSEY, R.S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **The Plant Cell**, 8:1735-1745, 1996.

WUYTS, N.; MAUNG, Z.T.Z.; SWENNEN, R.; WAELE, D. Banana rhizodeposition: characterization of root border cell production and effects on chemotaxis and motility of the parasitic nematode *Radopholus similis*. **Plant and Soil**, 283:217-228, 2006.

## CAPÍTULO I

### **Utilização do sistema radicular bipartido como ferramenta no estudo da interação entre acessos de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] e *Meloidogyne incognita***

#### **RESUMO**

O gênero *Pfaffia*, pertencente à família Amaranthaceae, contém ecdisteroides em teores consideráveis. Dentre as espécies encontra-se *P. glomerata*, cuja determinação do teor de  $\beta$ -ecdisona (20E), ecdisteroide de interesse, vem sendo realizada principalmente nas raízes. Entre as doenças que afetam o sistema radicular destacam-se as provocadas por nematoides do gênero *Meloidogyne*, que causam galhas e apodrecimento nas raízes. Entretanto, a presença desses nematoides gerou aumento no teor de 20E em diferentes acessos de *Pfaffia*, o que está correlacionado à possível interação positiva existente entre o desenvolvimento do nematoide e a produção do princípio ativo na planta, pois 20E é análogo aos hormônios envolvidos na ecdise. Dessa forma, plantas de *P. glomerata* [acessos 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)] com 30 dias de cultivo, propagadas *in vitro*, foram utilizadas. Contudo, para haver ausência de efeitos tóxicos do agente indutor (nematoide) sobre a planta hospedeira (fáfia), adotou-se a técnica de sistema radicular bipartido, onde foi adicionado em um dos vasos contíguos as concentrações de 0, 6.000, 12.000, 18.000, 24.000 e 30.000 ovos de nematoide *M. incognita*, gerando os tratamentos com e sem ovos de nematoide. Esses tratamentos permitiram verificar a comunicação sistêmica entre as raízes, o acúmulo do teor do princípio ativo (20E), além de determinar a tolerância de ambos os acessos ao nematoide *M. incognita*. Análises anatômicas demonstraram que o cilindro vascular das raízes do AC 22 apresentou número elevado de células gigantes, multinucleadas, com citoplasma denso, bem como compressão de células do córtex e do cilindro vascular, devido à presença dos sítios de alimentação em desenvolvimento, os quais comprimiram inclusive os elementos do xilema. Situação similar ocorreu no acesso 43, porém com menor número de células gigantes ao longo do sistema radicular, em comparação ao acesso 22. Os testes histoquímicos realizados indicaram reação positiva

para os corantes PAS, Sudan e Xylidine Ponceau. A produção das enzimas indicadoras do estado de indução à resistência de plantas, com a combinação dos acessos e a presença do nematoide inoculado em cada vaso, demonstrou haver desativação parcial da via de controle oxidativo, bem como da via de síntese constitutiva de compostos fenólicos e de quitinases.

## 1. INTRODUÇÃO

*Pfaffia glomerata* (fáfia), é uma planta endêmica das Américas, cuja importância advém do constituinte ativo  $\beta$ -ecdisona (20E), amplamente utilizado por indústrias farmacêuticas e cosméticas. A  $\beta$ -ecdisona é uma saponina esteroideal de efeito adaptógeno que atua na regeneração das células, na purificação do sangue, na inibição do crescimento de células cancerígenas, na regularização das funções hormonais e sexual, e como bioenergético (Coutinho et al., 2005).

Os ecdisteroides são hormônios esteroidais encontrados em artrópodes (zooecdisteroides) e em plantas (fitoecdisteroides) e suas estruturas estão disponíveis no Ecdybase (Lafont et al., 2002). Em insetos, a embriogênese, o desenvolvimento larval, a metamorfose e a muda são iniciados ou controlados por pulsos específicos do ecdisteroide 20-hidroxiecdisona (20E) (Makka et al., 2002). Diferentemente dos insetos, as plantas são capazes de produzir fitoecdisteroides a partir do ácido mevalônico (Alves, 2008). Os nematoides também pertencem ao clado Ecdysozoa, portanto, é provável que possuam regulação hormonal semelhante à dos insetos para a ecdise (Alves, 2008; Dinan et al., 2009).

Os levantamentos fitossanitários registram diversas pragas e doenças ocorrentes em fáfia e encontradas em coleções brasileiras, localizadas em diferentes regiões do país (Gomes, 2006). Entre essas doenças destacam-se as provocadas por nematoides do gênero *Meloidogyne*, que causam galhas e apodrecimento nas raízes (Araújo et al., 1994). No entanto, a presença desses nematoides gerou aumento no teor de 20E em diferentes acessos de *Pfaffia* (Carneiro et al., 2007; Gomes, 2006; Alves, 2008; Iarema, 2008). Tal fato pode estar correlacionado a uma possível interação positiva existente entre o desenvolvimento do nematoide e a produção do princípio ativo na planta, uma vez que 20E é análogo de hormônios envolvidos na ecdise (Dinan, 2001; Festucci-Buselli et al., 2008a; Dinan et al., 2009).

Entretanto, o acúmulo na concentração de 20E ocorre ao longo da vida da planta, mas, devido à migração dentro da planta, sua distribuição pode variar durante a ontogenia (Festucci-Buselli, 2008; Dinan et al., 2009) e acumular, por exemplo, no sistema radicular (Festucci-Buselli et al., 2008a), o que nos conduz a estabelecer uma relação entre a produção, localização e os danos causados, tanto no sistema radicular quanto na parte aérea da espécie.

Tendo em vista que os nematoides parasitam as raízes de *Pfaffia*, local de extração da substância utilizada na produção de fármacos (Gomes, 2006), e que a presença desses gerou aumento no teor de 20E em diferentes acessos de *Pfaffia* (Carneiro et al., 2007; Gomes, 2006; Alves, 2008; Iarema, 2008), há necessidade de avaliar acessos dessa planta quanto à resistência ao nematoide de galhas, e verificar se a presença desses nematoides influencia o acúmulo do teor do princípio ativo (20E).

Para tanto, deve-se recorrer a técnicas que permitam a separação espacial do agente indutor e da planta hospedeira, como por exemplo, a utilização do sistema radicular bipartido (Fabry, 2006).

Dessa forma, buscou-se analisar a interação dos acessos 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43) de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] com *Meloidogyne incognita*, verificando-se a eficiência de diferentes concentrações de inóculo na produção de  $\beta$ -ecdisona, utilizando o sistema radicular bipartido, abrangendo os aspectos fitoquímicos, anatômicos e histoquímicos, e avaliar os acessos de *P. glomerata* quanto à suscetibilidade ou resistência aos nematoides de galhas.

## **2.- METODOLOGIA**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT II), no Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides (BIONEMA) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), no Laboratório de Anatomia Vegetal, e no Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas do Centro de Ciências Biológicas (CCB II), na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

### **2.1 - Material Vegetal**

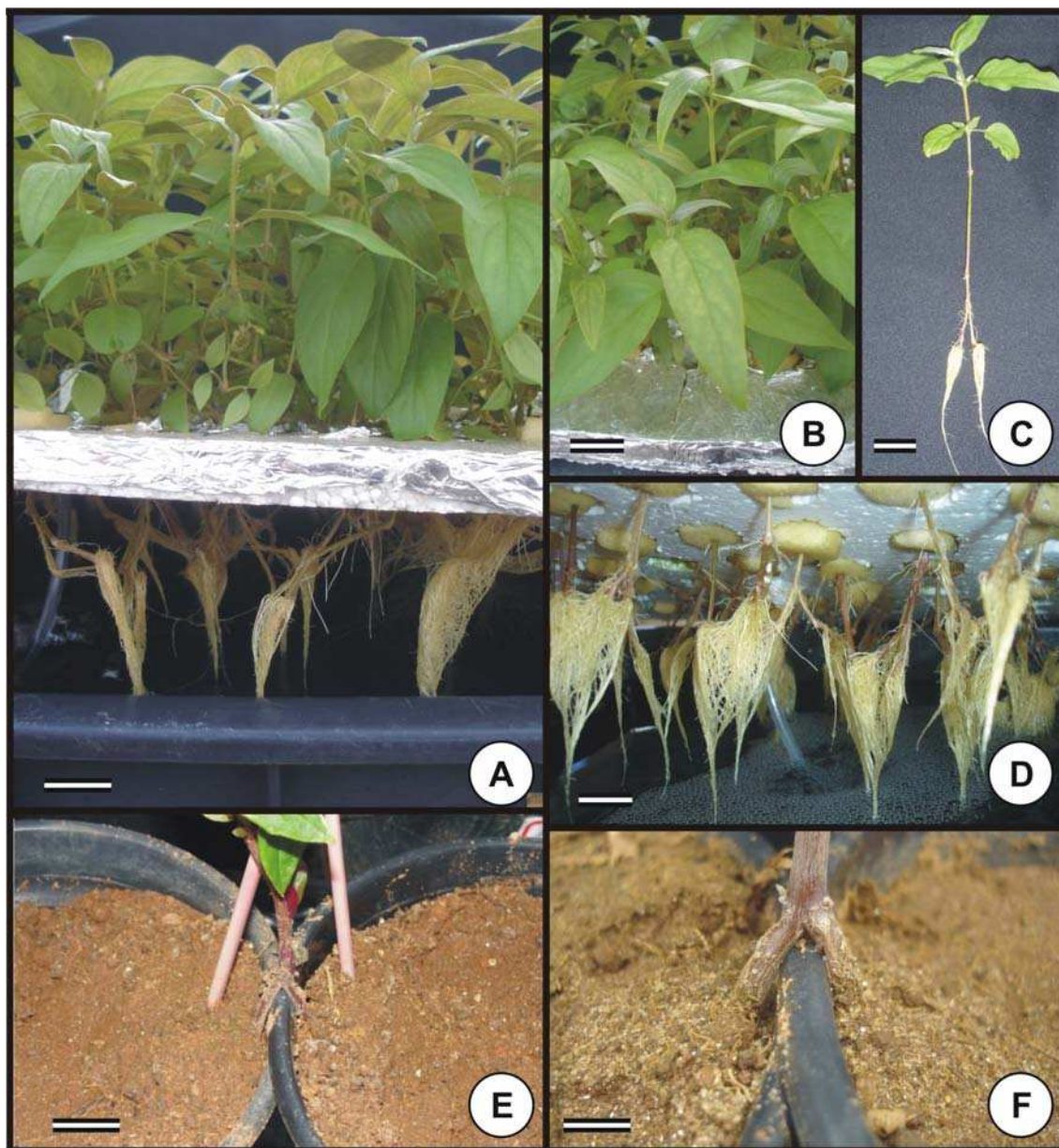
Os dois acessos utilizados de *P. glomerata* [acessos 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)] são procedentes de coleta em duas populações na bacia do rio Paraná, Brasil, e oriundas da coleção de germoplasma de plantas medicinais do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa/Cenargen). As populações foram coletadas nos Estados do Paraná e Mato Grosso do Sul.

Para estabelecimento do material estoque, utilizado para a montagem dos experimentos, os indivíduos (acessos) foram multiplicados vegetativamente *in vitro*, via segmento nodal, adaptando-se aos protocolos descritos por Nicoloso et al. (2001) e Kagiki (2004).

### **2.2 - Inoculação de *Meloidogyne incognita* em raízes bipartidas**

Para a obtenção do inóculo a ser utilizado nos experimentos, populações de *M. incognita* foram multiplicadas em raízes tomateiros cv. Santa Clara, em solo e areia estéril na proporção de 1:1 (v/v) e mantidos em casa de vegetação. Posteriormente, os ovos foram extraídos pelo método de Boneti & Ferraz (1981) e a concentração determinada em lâminas de Peters ao microscópio óptico.

Plantas de *P. glomerata* [acessos 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)] propagadas *in vitro* via segmentos nodais, com 30 dias de cultivo, foram excisadas na região do coleto para eliminação das raízes. Posteriormente, sob lupa binocular, o caule foi bipartido longitudinalmente em aproximadamente 5 cm em sua região proximal, e então cultivadas em hidroponia para desenvolver sistema radicular bipartido uniforme, bem como, para a rustificação (Figura 1).



**Figura 1** - Produção de plantas de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)] em sistema radicular bipartido. **A:** Plantas em cultivo de sistema de hidroponia com quinze dias após transferência do cultivo *in vitro*; **B:** Detalhe parte aérea; **C:** Planta inteira em sistema radicular bipartido; **D:** Detalhe raízes bipartidas em cultivo hidropônico; **E:** Detalhe de planta em sistema radicular bipartido após quinze dias do plantio em vaso, e, **F:** Detalhe de planta em sistema radicular bipartido após 90 dias do plantio em vaso. Barras = A, B, D=1,0 cm; C, F= 4,0 cm; E= 2,0 cm.

Para o cultivo em hidroponia foram utilizados os macronutrientes  $\text{KNO}_3$  ( $101,10 \text{ mg dm}^{-3}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $27,11 \text{ mg dm}^{-3}$ ),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $188,93 \text{ mg dm}^{-3}$ ) e  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  ( $42,56 \text{ mg dm}^{-3}$ ), com pH ajustado em  $\pm 5,5$ , onde as plantas permaneceram por aproximadamente 15 dias. Após esse período, foram transferidas para vasos com capacidade de 1,5 L, no qual cada parte enraizada foi plantada em vasos adjacentes.

Após quinze dias da transferência, ovos dos nematoides *M. incognita* foram adicionados ao solo em suspensão aquosa ao redor da planta nas concentrações de 0, 6.000, 12.000, 18.000, 24.000 e 30.0000 ovos, em um dos vasos contendo metade do sistema radicular da planta (Fig. 1E). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação à temperatura de 28 °C.

Foi utilizado o adubo «Ouro Verde» nº 3 (25% N total, 15% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 10% K<sub>2</sub>O, 0,7% B e 0,7% Zn), para fertilizar o solo (substrato) dos vasos aos 30 dias, após a transferência.

Transcorridos 90 dias, após a inoculação de ovos de nematoide no solo, as seguintes variáveis foram avaliadas: massa seca da parte aérea e do sistema radicular, número de galhas e número de ovos por sistema radicular. Foi determinado o teor do princípio ativo (20E), sendo esse analisado na parte aérea e nas raízes desenvolvidas em ambos os vasos (inoculado e não-inoculado).

### **2.3 - Análise química**

A determinação do teor de  $\beta$ -ecdisona (20E) foi quantificada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), analisando-se amostras de massa seca das raízes e da parte aérea, obtidas por extrato metanólico. Utilizou-se o método descrito por Kamada (2006), e o material processado acondicionado em freezer (-20 °C).

As amostras foram preparadas a partir de 100 mg de material vegetal para 10 mL de metanol, as quais ficaram armazenadas em temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), durante oito dias, sob agitação diária do extrato. Após esse período, os extratos foram centrifugados (15 minutos/5.000 rpm) e o sobrenadante coletado. Depois de obtido o extrato metanólico, foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando as seguintes condições: equipamento da Shimadzu modelo LC-10AI, equipado com detector SPD-10AI, CBM-10A; coluna Bomdesil C 18 (5,0  $\mu$ m x 4,6 mm x 250 mm); fase móvel metanol (100 %) com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>; volume de amostra injetada de 20  $\mu$ L; leitura em  $\lambda = 245$  nm; e tempo médio de corrida das amostras de raízes foi de 10 minutos. Para as amostras da parte aérea, a fase móvel foi composta por metanol-água na proporção 50:50 (v/v), com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup> e tempo de corrida da amostra de 15 minutos. Os dados foram integrados por meio do "software" Shimadzu LC10.

A curva de calibração foi obtida com padrão de 97% de pureza de  $\beta$ -ecdisona (Sigma Chem. Co., EUA), em concentrações de 10, 40, 60, 80, 90, 100, 120 e 200 mg L<sup>-1</sup> metanol, os quais foram injetados (20  $\mu$ L). Os valores obtidos nos cromatogramas, correspondentes às concentrações das amostras-padrão, foram plotados no gráfico e obtido a equação para cálculo do teor de  $\beta$ -ecdisona dos indivíduos.

#### **2.4 - Determinações de galhas e ovos**

As plantas foram retiradas dos vasos, a parte aérea removida e as raízes lavadas. O número de galhas e de ovos foi contado por sistema radicular. Para tal, as raízes provenientes da metade do sistema radicular foram mergulhadas em água, para remoção do solo, e foram colocadas em recipiente fechado contendo 250 mL de hipoclorito de sódio a 0,5 %, durante três minutos sob agitação constante. Posteriormente, lavadas em peneiras granulométricas sobrepostas, sendo a superior de 100 'mesh' (com abertura de 0,074 mm) e a inferior de 500 'mesh' (com abertura de 0,025 mm). A suspensão retida na última peneira foi recolhida em tubos de ensaio (25 x 150 mm) e a contagem do número de ovos realizada com o auxílio de câmara de Peters em microscópio estereoscópico.

#### **2.5 - Análises estruturais e histoquímica**

Amostras das raízes relativas à outra metade do sistema radicular foram fixadas em FAA 50 (formol + ácido acético + álcool 50%), por 24 horas, e estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940). Posteriormente, foram desidratadas em série etílicas e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Secções transversais foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA), com utilização de navalhas de vidro descartável. Os cortes (8  $\mu$ m de espessura) foram corados com Azul de Toluidina pH 4,0 (O'Brien & McCully 1981) para caracterização estrutural, e as lâminas montadas em Permount. Para evidenciar a presença de compostos secundários foi utilizado: floroglucina (Johansen, 1940) para lignina; vermelho de rutênio (Johansen, 1940) para pectinas; PAS (Maia, 1979) para carboidratos; sudan (Gerlach, 1984) para lipídios; lugol (Johansen, 1940) para amido, e xylydine Ponceau (O'Brien & McCully 1981) para proteínas.

Todas as lâminas foram examinadas e fotografadas em fotomicroscópio (modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) equipado com o sistema U-Photo.

## **2.6 - Detecções da atividade das enzimas indicadoras do estado de indução a resistência de plantas**

Para as determinações das atividades de enzimas peroxidases, fenilalanina amônia-liase, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases, 5 g de folhas e raízes foram maceradas em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo. O pó obtido foi homogeneizado com polivinilpirrolidona (PVPP) 2%, e em seguida, com tampão extrato Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, (extração 1:3 g:mL), acrescido de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e benzamidina, ambos na concentração final de 1 mM. O extrato obtido foi centrifugado a 20.000 g, 4 °C, por 25 minutos, e os sobrenadantes recolhidos. As enzimas foram analisadas em triplicatas.

## **2.7 – Determinações da concentração de proteínas totais**

A quantificação de proteínas totais foi feita utilizando o método de Bradford (1976). A absorvância foi medida em leitor de microplacas utilizando o comprimento de onda de 595nm. Para se determinar a concentração de proteínas, preparou-se uma curva-padrão com BSA (albumina soro bovina) como proteína padrão, entre 0 e 40  $\mu$ g de BSA. A equação da reta da curva padrão ajustada foi  $y = 0,0865x + 0,0843$ , com  $R^2 = 0,9928$ . Foram utilizadas amostras em triplicata, contendo 20  $\mu$ L cada.

## **2.8 - Detecções da atividade de Peroxidases (POD)**

A atividade das peroxidases foi determinada a 30 °C, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (Hammerschmidt et al., 1982). A mistura de reação constituiu de 1019  $\mu$ L de uma solução de reação (constituída na proporção de 125  $\mu$ L de guaiacol, 153  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio em 50 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0, e 1  $\mu$ L do extrato vegetal). A reação foi incubada em banho-maria e, em seguida, foram realizadas as leituras de absorvância, no comprimento de onda de 470 nm, nos tempos de 30 segundos e 10 minutos e 30 segundos, após o início

da reação. A atividade das peroxidases foi expressa em unidades de absorvância  $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g prote\u00edna}^{-1}$  (U.A  $\text{min}^{-1} \mu\text{g prote\u00edna}^{-1}$ ).

### 2.9 - Detec\u00e7\u00f5es de Fenilalanina Am\u00f4nia-liase (PAL)

Para detec\u00e7\u00e3o da atividade de PAL, foi utilizado o m\u00e9todo descrito por Pascholati et al. (1986), pela quantifica\u00e7\u00e3o colorim\u00e9trica do \u00e1cido *trans*-cin\u00e2mico liberado do substrato fenilalanina, com pequenas modifica\u00e7\u00f5es. Determinou-se a atividade por medida espectrofotom\u00e9trica direta, pela convers\u00e3o de L-fenilalanina para \u00e1cido cin\u00e2mico a 290 nm e 37 °C, nos tempos de 30 segundos, e seguido por 5 minutos e 30 segundos ap\u00f3s o in\u00edcio da rea\u00e7\u00e3o. A mistura de rea\u00e7\u00e3o foi composta de 10  $\mu\text{L}$  do extrato vegetal e 1000  $\mu\text{L}$  de uma solu\u00e7\u00e3o 0,2% de L-fenilalanina. A varia\u00e7\u00e3o ( $\Delta$ ) das leituras de absorv\u00e2ncia foram plotadas em curva padr\u00e3o para \u00e1cido cin\u00e2mico:

$$y = 0,3621x - 0,3891, R^2 = 0,9968,$$

em que y representa o valor da absorv\u00e2ncia a 290 nm, e x representa os nmoles de \u00e1cido cin\u00e2mico produzido. Os resultados foram expressos como atividade espec\u00edfica:  $\text{nmol \u00e1cido cin\u00e2mico min}^{-1} \mu\text{g prote\u00edna}^{-1}$ .

### 2.10 – Atividades de Quitinases

A atividade de quitinases foi avaliada pela varia\u00e7\u00e3o colorim\u00e9trica do produto liberado na rea\u00e7\u00e3o com o substrato *Chitin Azure*, na qual ocorre a libera\u00e7\u00e3o de fragmentos sol\u00faveis de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (CM-Chitin-RBV), segundo m\u00e9todo descrito por Thompson et al. (2001). Uma massa de 50  $\mu\text{g}$  do substrato foi utilizada em cada rea\u00e7\u00e3o, constituindo uma concentra\u00e7\u00e3o final do substrato de 1% (p/v) de mistura de rea\u00e7\u00e3o.

*Chitin Azure* (50  $\mu\text{g}$ ) foi pesada em eppendorf com capacidade para 1 mL, seguido do acr\u00e9scimo de 600  $\mu\text{L}$  de tamp\u00e3o de extra\u00e7\u00e3o e 400  $\mu\text{L}$  do extrato vegetal. Na rea\u00e7\u00e3o-controle, o extrato vegetal foi substituído por tamp\u00e3o de extra\u00e7\u00e3o, no mesmo volume. Os ensaios foram incubados a 25 °C por 48 horas, em mesa agitadora orbital a 120 rpm. Em seguida a absorv\u00e2ncia foi determinada.

Para o c\u00e1lculo da atividade espec\u00edfica, utilizou-se a diferen\u00e7a entre o valor de absorv\u00e2ncia de cada amostra e o valor de absorv\u00e2ncia do controle. Os resultados finais foram expressos em atividade de quitinase  $\text{dia}^{-1} \mu\text{g quitina}^{-1} \mu\text{g prote\u00edna}^{-1}$ .

### **2.11 – Atividades de $\beta$ -1,3-glucanases**

A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases nas amostras foi determinada pela variação colorimétrica de glicose liberada do substrato laminarina usando hidrazina do ácido p-hidrobenczóico (HAPHB) (Lever, 1972). A mistura de reação foi incubada a 45 °C por 1 hora, contendo 220  $\mu$ L do tampão de extração (acetato de sódio 10 mM, pH 5,0), 250  $\mu$ L da solução de substrato (laminarina 4 mg mL<sup>-1</sup>) e 30  $\mu$ L do extrato vegetal. Após esse período, foram acrescentados 1,5 mL de HAPHB, solução de desenvolvimento de cor (0,5 g da HAPHB dissolvido em 10 mL de HCl 0,5M, acrescido de 50 mL de NaOH 0,5 M), sendo esta mistura, em seguida, aquecida a 100 °C por 5 minutos.

Após resfriamento em gelo até a temperatura de 30 °C determinou-se a absorvância das amostras, utilizando-se um comprimento de onda de 410 nm. O valor de absorvância de cada amostra foi subtraído pelo valor de absorvância do controle (correspondente à mistura idêntica à da amostra, porém sem incubação prévia). Os resultados foram expressos em unidades de absorvância.min<sup>-1</sup>. $\mu$ g proteína<sup>-1</sup>.

### **2.12 - Análise estatística**

Os experimentos foram realizados duas vezes, portanto, após Análise de Grupos de Experimentos (teste F<sub>máximo</sub>) (Pimentel-Gomes, 2000), optou-se por utilizar a média de ambos os experimentos conjuntamente. A determinação de galhas e ovos ocorreu em apenas ¼ do sistema radicular completo, visto que metade do sistema radicular se encontrava em vasos distintos (sistema radicular bipartido) e a avaliação ocorreu com a retirada da quarta parte de raízes de cada vaso para as análises destrutivas.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com nove repetições, sendo cada unidade experimental constituída por uma planta. Para as análises químicas foram utilizadas cinco repetições por tratamento. Para a análise do sistema radicular foram utilizados dois tratamentos [Com e Sem (presença e ausência do inóculo, respectivamente)] em todas as concentrações de ovos. Os dados observados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e quando pertinente aplicado o teste de Tukey, utilizando-se o programa Statistica (Stat Soft, 2004).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. - Análise Química

Análises estatísticas do teor de  $\beta$ -ecdisona (20E %) dos dados oriundos do sistema radicular do AC 22 de fáfia demonstraram não haver diferença estatística, a 5% de significância pelo teste Tukey, para os tratamentos (vasos com o inóculo e sem o inóculo). Porém, houve diferença estatística para a concentração do inóculo (ovos de nematoide), sendo a maior média com concentração de 30.000 ovos vaso<sup>-1</sup> e a menor média o controle (0 ovos vaso<sup>-1</sup>) (Tabela 1). No entanto, para o acesso 43 houve diferença estatística tanto para o tratamento quanto para a concentração do inóculo, porém não houve interação entre ambos. A maior média entre os tratamentos foi para o vaso que continha o inóculo (0,47 %) e a menor para o controle (0,40 %). Contudo, ao analisar concentração do inóculo a maior média ocorreu em presença de 30.000 ovos de nematoides vaso<sup>-1</sup> em relação às demais concentrações (Tabela 1).

Quando analisado a parte aérea de ambos os acessos, para o teor de  $\beta$ -ecdisona (20E %) não houve diferença estatística a 5% de significância pelo teste Tukey, em nenhuma concentração de inóculo utilizada (Tabela 1).

**Tabela 1** – Médias do teor de  $\beta$ -ecdisona (20E %) no sistema radicular e parte aérea de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)], de acordo com a concentração do inóculo (número de ovos vaso<sup>-1</sup>) de *M. incognita*

Concentração do Inóculo	Sistema Radicular		Parte Aérea	
	AC 22	AC 43	AC 22	AC 43
0	0,51 C*	0,41 B	0,26 A	0,40 A
6.000	0,57 BC	0,40B	0,25 A	0,39 A
12.000	0,57 BC	0,41 B	0,30 A	0,51 A
18.000	0,54 BC	0,44 B	0,27 A	0,43 A
24.000	0,67 AB	0,44 B	0,22 A	0,43 A
30.000	0,72 A	0,55 A	0,21 A	0,35 A

\*As médias seguidas de uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

### 3.2 – Determinações de galhas, ovos e massa seca

A quantidade, tanto de ovos de *M. incognita* quanto de galhas induzidas por esse, no acesso 22 demonstrou haver diferença estatística, a 5% de significância pelo teste Tukey, para os tratamentos (com e sem o inóculo), concentrações (ovos de nematoide vaso<sup>-1</sup>), e interação entre ambos (Tabela 2).

Na análise de massa seca foi observado haver diferença estatística entre os tratamentos. Porém não houve diferença estatística entre as combinações de inóculo. As maiores médias ocorreram quando foram adicionados inóculos de nematoide, tendo média de 4,01 g nas raízes com o inóculo e média de 2,86 g nas raízes sem o inóculo (Tabela 2).

**Tabela 2** – Médias dos números de galhas e de ovos e massa seca (g) encontrados no sistema radicular de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22)], de acordo com a concentração do inóculo (número de ovos vaso<sup>-1</sup>) de *M. incognita*.

Concentração do Inóculo	Número de galhas		Número de ovos		Massa seca (g)	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
0	0	0 B*	0	0 B	3,40aA*	3,75bA
6.000	0	245,88 A	0	575061,70A	2,43aA	4,41bA
12.000	0	284,22 A	0	777131,70A	2,78aA	4,43bA
18.000	0	267,66 A	0	500298,30A	3,00aA	3,82bA
24.000	0	205,11 A	0	596450,60A	3,12aA	3,71bA
30.000	0	281,22 A	0	538761,70A	2,47aA	3,95bA

\*As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas, na horizontal, equivalem a diferenças entre os tratamentos e letras maiúsculas, na vertical, equivalem a diferenças entre as concentrações de ovos de nematoide.

Não houve diferença estatística, a 5% de significância pelo teste Tukey, para os tratamentos (com e sem o inóculo), concentrações (ovos de nematoide vaso<sup>-1</sup>), e interação entre ambos, para a quantidade de galhas induzidas por ovos do nematoide *M. incognita*, no acesso 43 (Tabela 3). Da mesma forma, não houve diferença estatística nas avaliações de massa seca. Entretanto, ao analisarmos a variável número de ovos

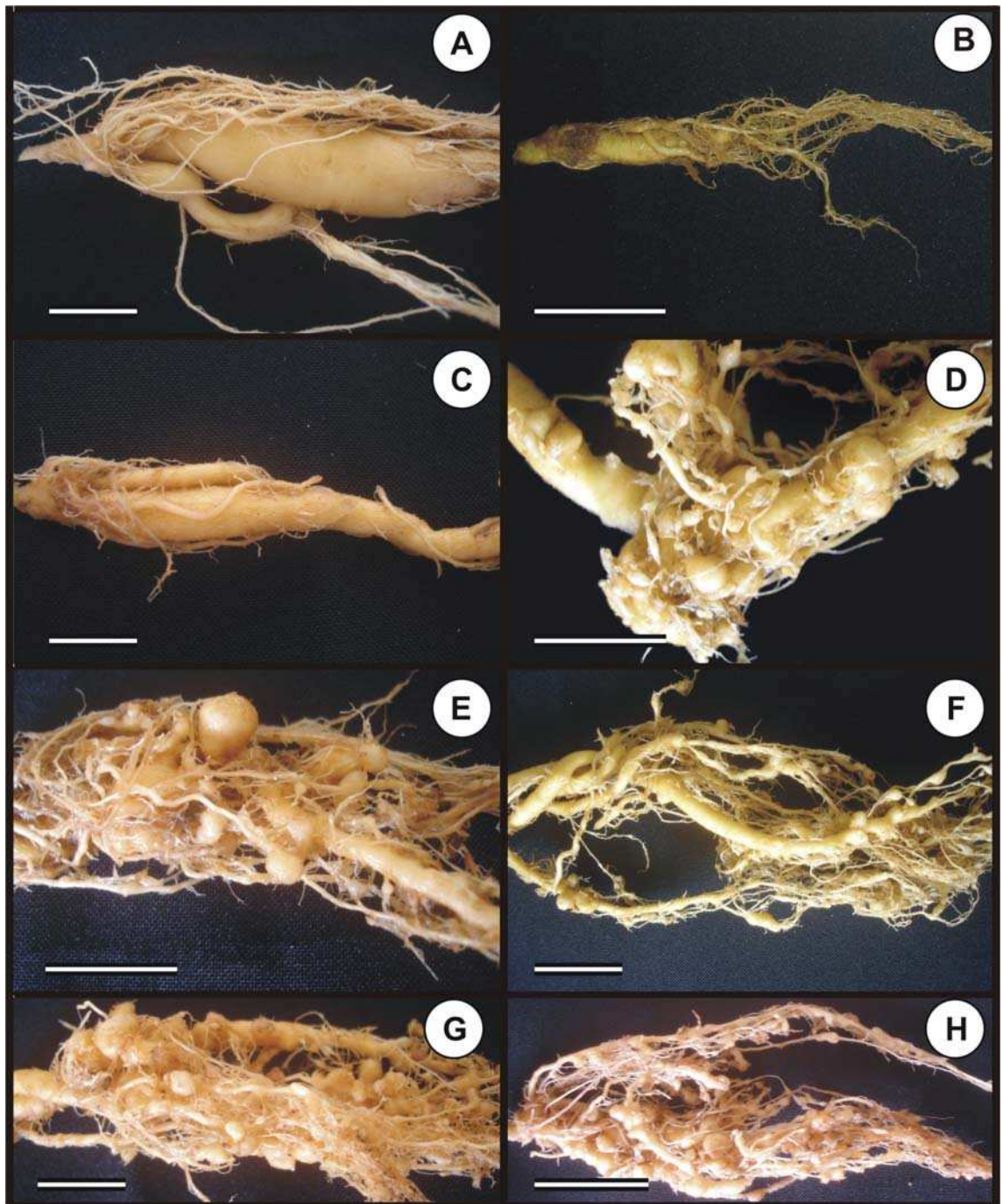
houve diferença estatística entre os tratamentos, concentração e interação entre ambos, sendo as maiores médias encontradas quando da presença do inóculo. (Tabela 3).

**Tabela 3** – Médias do número de galhas, ovos e massa seca (g) encontrados no sistema radicular de *P. glomerata* [acesso 2209-09 (AC 43)], de acordo com a concentração do inóculo (número de ovos vaso<sup>-1</sup>) de *M. incognita*.

Concentração do Inóculo	Número de galhas		Número de ovos		Massa seca (g)	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
0	0	0	0	0 B*	5,14A	5,33A
6.000	0	0	0	246687,20A	4,85A	4,68A
12.000	0	0	0	223660,60A	4,88A	4,61A
18.000	0	0	0	291493,90A	4,94A	4,58A
24.000	0	0	0	274388,90A	4,30A	4,17A
30.000	0	0	0	271131,70A	5,13A	4,03A

\*As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os sintomas morfológicos nas raízes infectadas foram similares entre as concentrações do inóculo, não foi detectada a presença de galhas nas raízes do acesso 43 (Fig. 2A), porém a presença de galhas foi característica em todos os tratamentos cujo sistema radicular foi constituído pelo acesso 22 (Fig. 2D – H). A parte aérea das plantas não ficou comprometida durante a realização dos experimentos, ocorrendo novas brotações ao longo do experimento.



**Figura 2** - Raízes de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)], com 90 dias de cultivo, de acordo com a quantidade de ovos do nematoide *M. incognita* inoculado vaso<sup>-1</sup>. **A:** Raiz do AC 43 retirada do vaso contendo inóculo; **B:** Raiz do AC 22 retirada do vaso sem inóculo; **C:** Raiz do AC 22 retirada do vaso controle de concentração 6.000 ovos de nematoide vaso<sup>-1</sup>; **D:** Raiz do AC 22 retirada do vaso contendo 6.000 ovos de nematoide vaso<sup>-1</sup>; **E:** Raiz do AC 22 retirada do vaso contendo 12.000 ovos de nematoide vaso<sup>-1</sup>; **F:** Raiz do AC 22 retirada do vaso contendo 18.000 ovos de nematoide vaso<sup>-1</sup>; **G:** Raiz do AC 22 retirada do vaso contendo 24.000 ovos de nematoide vaso<sup>-1</sup>, e **H:** Raiz do AC 22 retirada do vaso contendo 30.000 ovos de nematoide vaso<sup>-1</sup>. Barras: A;B;F;G = 1,0 cm, C= 5,0 cm, D; E= 1,5 cm, e, H=3,7 cm.

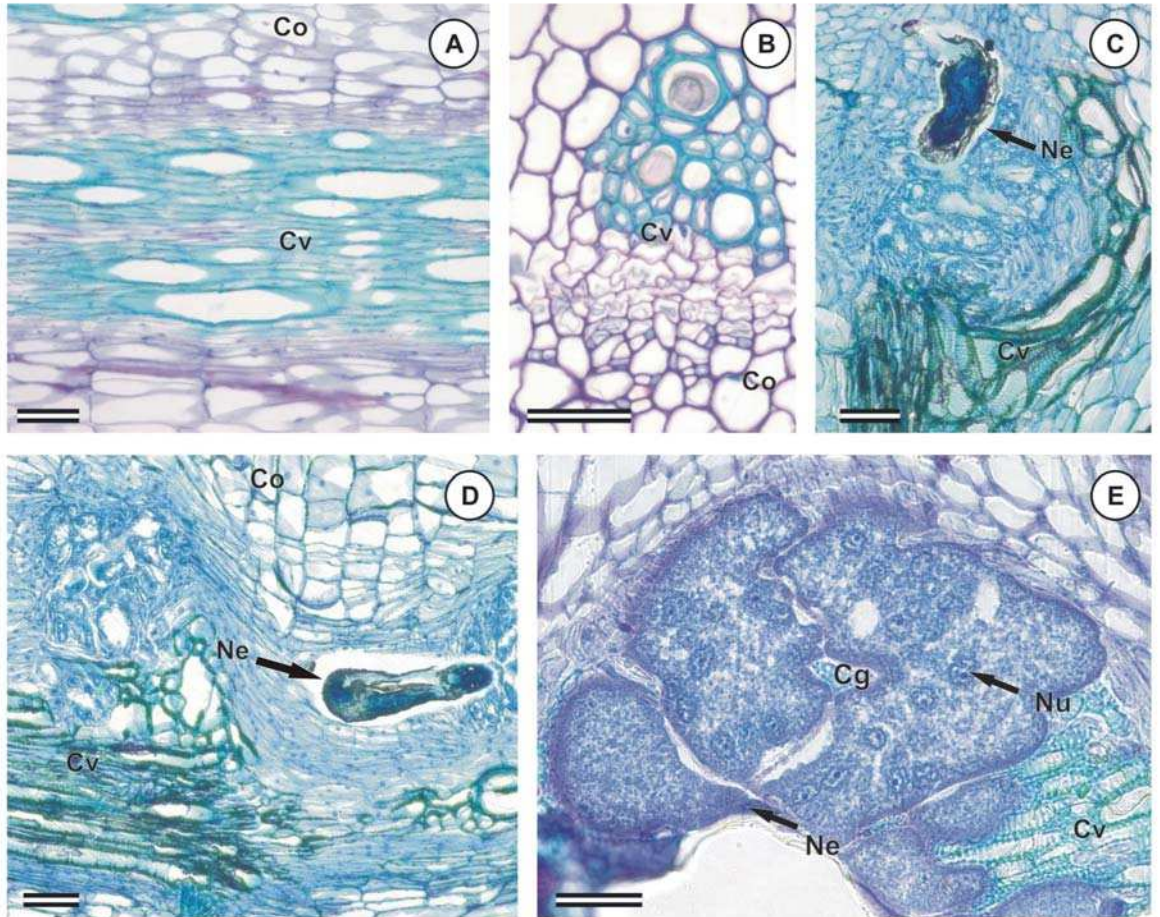
### 3.3 – Análises estruturais e histoquímica

A análise estrutural dos acessos de *P. glomerata* AC 22 e AC 43, inoculados com *M. incognita*, demonstrou que o cilindro vascular das raízes do acesso 22 apresentou número elevado de células gigantes, multinucleadas, com citoplasma denso. Houve ainda compressão de células do córtex e do cilindro vascular, devido à presença dos sítios de alimentação em desenvolvimento, os quais comprimiram inclusive os elementos do xilema, tendo o mesmo ocorrido no acesso 43, porém com menor número de células gigantes ao longo do sistema radicular, em comparação ao acesso 22 (Fig. 3).

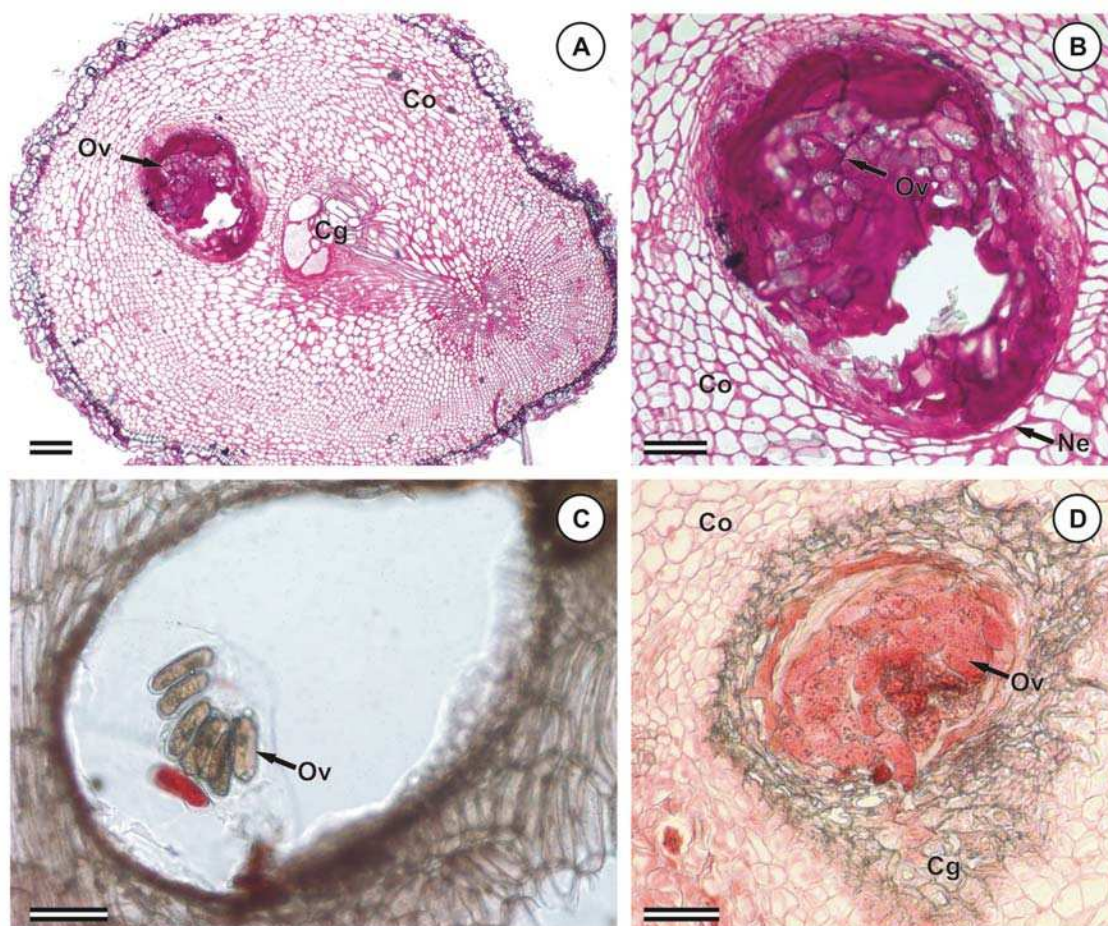
Massas de ovos também foram observadas em ambos os acessos. Não foi observada diferença estrutural entre os acessos, somente entre tratamentos devido à presença dos nematoides.

As secções anatômicas coradas com azul de toluidina indicaram a ocorrência de compostos fenólicos durante a formação das células gigantes, enquanto o cilindro vascular sofria compressão (Fig. 3C – D).

Os testes histoquímicos realizados indicaram reação positiva para os corantes PAS, Sudam e xylidine Ponceau (Tabela 4).



**Figura 3** - Análise estrutural do sistema radicular dos acessos de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)], inoculados com *M. incognita*. **A:** corte longitudinal do controle; **B:** corte transversal do controle; **C:** corte transversal demonstrando o início de formação das células gigantes; **D:** início do desenvolvimento do sítio de alimentação, o qual comprimiu o cilindro vascular em corte transversal; **E:** Estabelecimento do sítio de alimentação, com desenvolvimento da fêmea (nematode) também em corte transversal. Barra: A - D= 100 µm; E= 50 µm. Legenda: Co = córtex, Cv = cilindro vascular, Cg = célula gigante, Ne = nematoide (Fêmea), e, Nu = núcleo.



**Figura 4** - Análise histoquímica do sistema radicular dos acessos de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)], inoculados com *M. incognita*. Secções longitudinais. **A:** galha com teste PAS, resultado positivo, maior intensidade do corante na fêmea; **B:** Detalhe da intensidade do corante PAS em ovos de *Meloidogyne incognita* dentro da fêmea madura; **C:** Teste com Sudan, teste positivo somente no corpo da fêmea, com destaque para a massa de ovos; **D:** teste com xylidine Ponceau, maior intensidade do corante no corpo da fêmea, destacando ovos no seu interior: A= 200  $\mu\text{m}$ ; B, C, D= 100  $\mu\text{m}$ . Legenda: Co = córtex, Cg = célula gigante, Ne = nematoide (Fêmea), e, Ov = ovos do nematoide.

**Tabela 4** - Testes histoquímicos efetuados nos acessos de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)] encontrados no sistema radicular, de acordo com o tratamento aplicado.

Testes histoquímicos	Tratamento	
	Sem	Com
Floroglucina (lignina)	-	-
Vermelho de rutênio (pectinas)	-	-
PAS (carboidratos)	+	++
Sudan (lipídios)	-	+
Lugol (amido)	-	-
Xylidine Ponceau (proteínas)	+	++

Abreviações: (-) reação negativa; (+) reação positiva; e (++) reação positiva intensa.

### 3.4 - Detecções da atividade das proteínas totais e das enzimas indicadoras do estado de indução a resistência de plantas

#### a) Parte Aérea

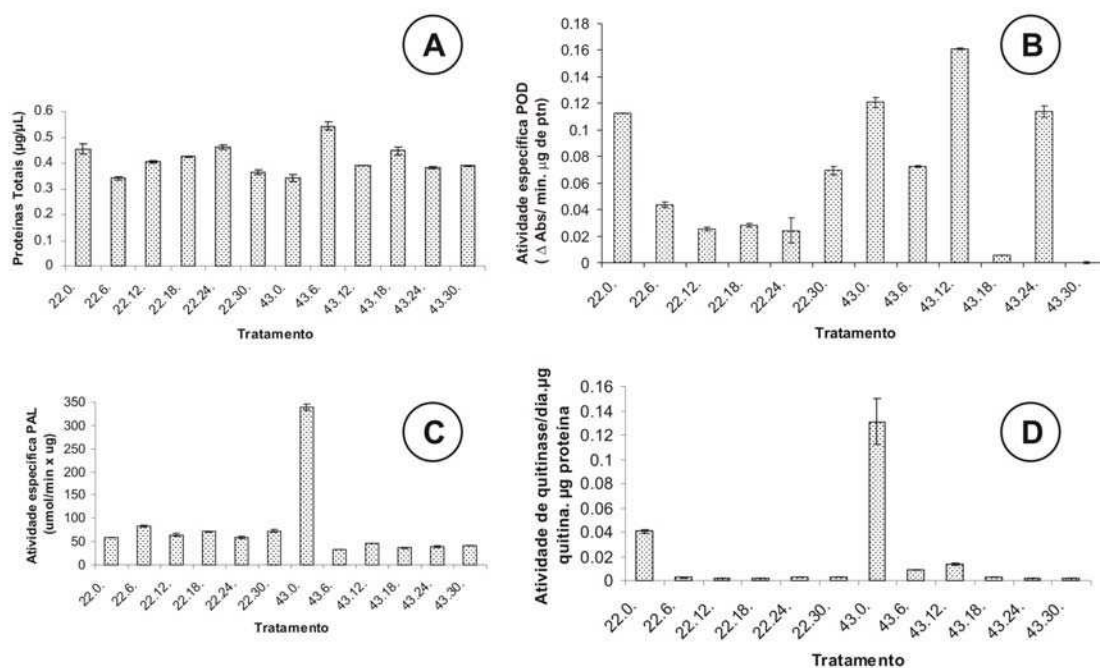
O acesso 22 expressou maior quantidade de proteínas totais a partir da concentração inicial de 6.000 ovos do nematoide vaso<sup>-1</sup> com redução na concentração de 30.000 ovos vaso-1 o que não foi observado no controle (Fig. 5A). No entanto, o acesso AC 43 apresentou maior expressão de proteínas totais na concentração de 6.000 ovos do nematoide vaso<sup>-1</sup>, não havendo diferença nas concentrações de 12.000, 24.000 e 30.000 ovos vaso<sup>-1</sup>, bem como o controle (Fig. 5A).

A atividade da enzima peroxidase (POD) expressa na parte aérea de *P. glomerata* (AC 22) foi maior no controle e na concentração de 30.000 ovos do nematoide vaso<sup>-1</sup> (Fig. 5B). No entanto, ao observarmos a atividade da enzima POD expressa na parte aérea de *P. glomerata* (AC 43), houve maior aumento na concentração de 12.000 ovos do nematoide, e as menores expressões ocorreram nas concentrações de 18.000 e 30.000 ovos de *M. incognita* vaso<sup>-1</sup> (Fig. 5B).

Com relação à atividade da enzima PAL expressa no acesso 22 foi observada constância em todos os tratamentos, porém ao observarmos o acesso 43 houve maior atividade no tratamento testemunha (Fig. 5C).

A atividade de quitinase, observada na parte aérea de *P. glomerata* tanto no acesso 22 quanto no acesso 43, apresentou maior expressão no controle, tendo os demais tratamentos pequena quantidade em comparação ao controle (Fig. 5D).

Tanto no acesso 22 quanto no 43, em todos os tratamentos e concentrações, não foi detectada atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase, em análises da parte aérea e do sistema radicular.



**Figura 5** – Atividade das enzimas indicadoras do estado de indução da resistência de plantas encontradas na parte aérea de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)], com 90 dias de cultivo, de acordo com a quantidade de ovos do nematoide *M. incognita* inoculado vaso<sup>-1</sup>. Barras indicam erro padrão da média. **A:** Proteínas Totais; **B:** Peroxidase (PO); **C:** Fenilalanina Amônia-liase (PAL); **D:** Quitinase.

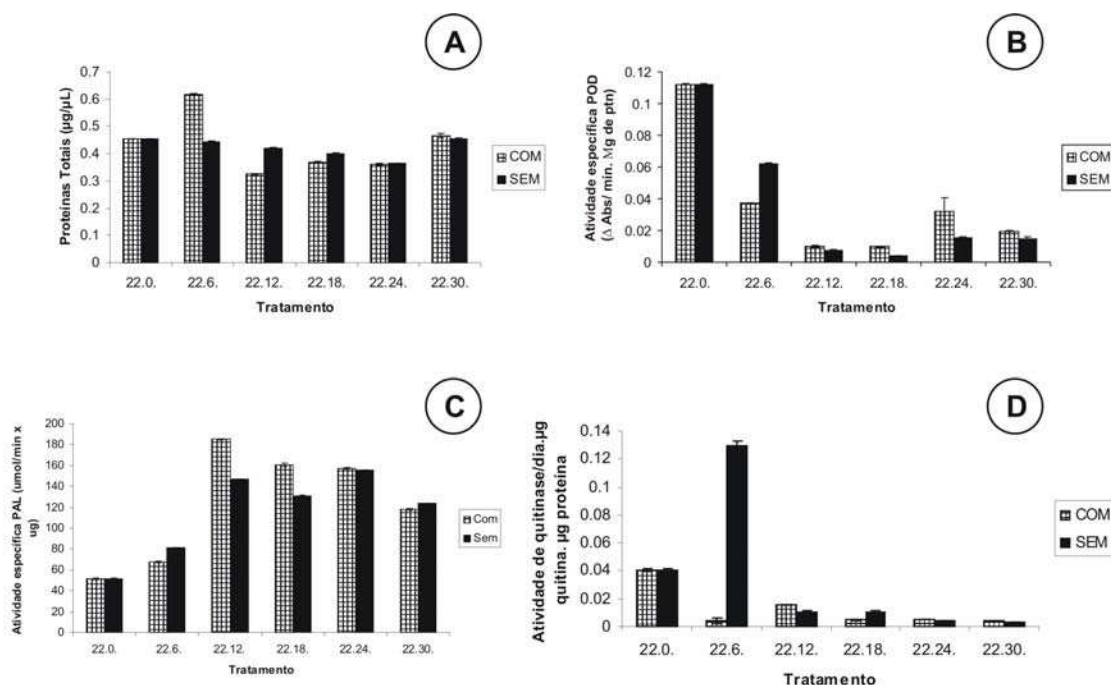
### b) Sistema Radicular

Ao observarmos a expressão de proteínas totais no sistema radicular do acesso 22, verifica-se que a presença do inóculo não foi determinante para o aumento das mesmas (Fig. 6A). Entretanto, a presença de ovos do nematoide na concentração de 6.000 ovos vaso<sup>-1</sup> induziu maior aumento quando comparado às demais concentrações.

Ao observarmos a atividade de POD encontradas no sistema radicular de *P. glomerata* (AC 22) verificou-se maior quantidade nos controles. Porém, houve tendência de aumento nas concentrações 12.000, 18.000, 24.000 e 30.000 ovos do nematoide vaso<sup>-1</sup> nos tratamentos com presença do nematoide (Fig 6B).

Comparativamente à quantidade de PAL expressa na parte aérea de *P. glomerata*, no acesso 22, a quantidade encontrada no sistema radicular nesse acesso é maior, havendo tendência de aumento nos tratamentos em presença nematoide, à exceção da concentração de 6.000 ovos vaso<sup>-1</sup> e maior quantidade na concentração de 12.000 ovos do nematoide vaso<sup>-1</sup> (Fig. 6C).

A atividade de quitinase no acesso 22 ocorreu com maior expressão no tratamento sem o agente inoculante, principalmente na concentração de 6.000 ovos vaso<sup>-1</sup>. (Fig 6D).



**Figura 6** – Atividade das enzimas indicadoras do estado de indução a resistência de plantas encontradas no sistema radicular de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22)], com 90 dias de cultivo, de acordo com a quantidade de ovos do nematoide *M. incognita* inoculado vaso<sup>-1</sup>. Barras indicam erro padrão da média. **A:** Proteínas Totais; **B:** Peroxidase (PO); **C:** Fenilalanina Amônia-liase (PAL); **D:** Quitinase.

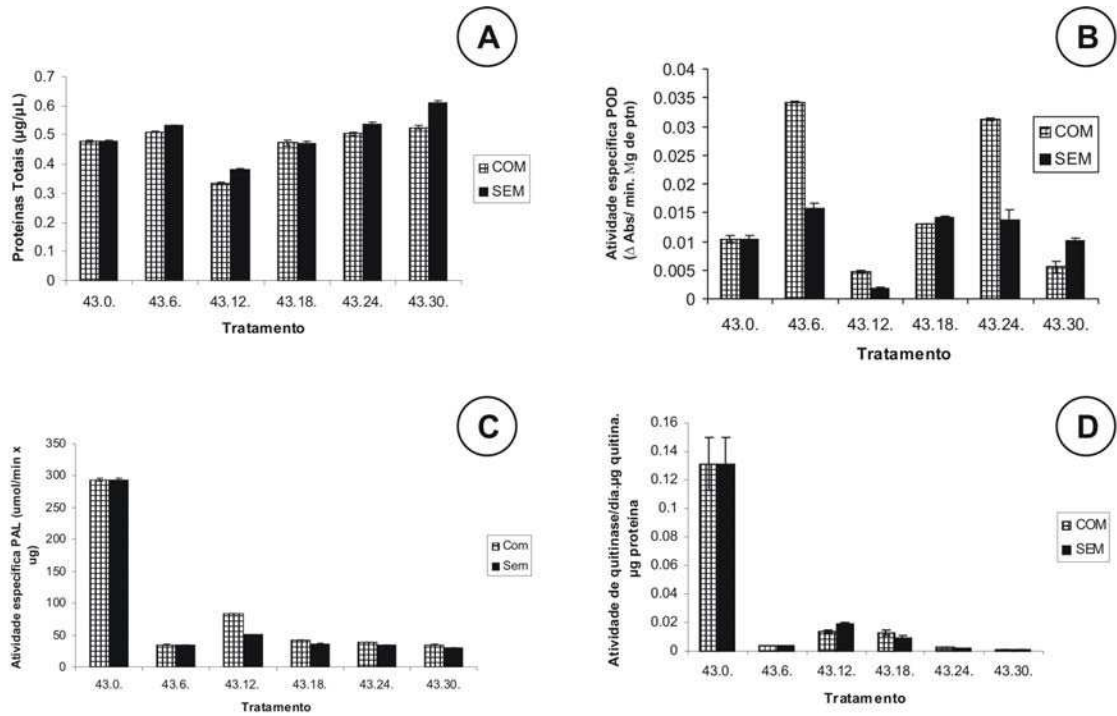
Inversamente ao observado no acesso 22, o acesso 43 apresentou maior expressão de proteínas totais, no sistema radicular, nos tratamentos em que não houve a presença do inóculo (Fig. 7A). A menor média ocorreu na concentração de 12.000 ovos vaso<sup>-1</sup> e a maior média na concentração de 30.000 ovos vaso<sup>-1</sup>.

A atividade de peroxidases (PO) encontradas no sistema radicular de *P. glomerata* (AC 43) demonstrou maior expressão nas concentrações 6.000 e 24.000 ovos do nematoide *M. incognita* vaso<sup>-1</sup> nos tratamentos com presença do agente inoculado, porém a menor quantidade ocorreu nas concentrações 12.000 e 30.000 ovos vaso<sup>-1</sup> em ambos os tratamentos (com e sem ovos inoculados) (Fig. 7B).

Da mesma forma que o observado para o acesso 22, no acesso 43 houve tendência de maior expressão de PAL nos tratamentos com a presença do agente

inoculado, porém a maior atividade foi observada no controle em ambos os tratamentos (Fig. 7C).

Em ambos os acessos, a maior expressão de quitinase ocorreu no controle, com decréscimo nas concentrações subsequentes. (Fig. 7D).



**Figura 7** – Atividade das enzimas indicadoras do estado de indução a resistência de plantas encontradas no sistema radicular de *P. glomerata* [acesso 2209-09 (AC 43)], com 90 dias de cultivo, de acordo com a quantidade de ovos do nematoide *M. incognita* inoculado vaso<sup>-1</sup>. Barras indicam erro padrão da média. **A:** Proteínas Totais; **B:** Peroxidase (PO); **C:** Fenilalanina Amônia-liase (PAL); **D:** Quitinase.

#### 4. DISCUSSÃO

Em algumas espécies de Amaranthaceae são encontrados ecdisteroides em teores consideráveis (Savchenko et al., 1998), incluindo o gênero *Pfaffia* (Nishimoto et al., 1987; 1988; Shiobara et al., 1993; Baltaev, 2000). Dentre as espécies encontra-se *P. glomerata* (Shiobara et al., 1993), cuja determinação do teor de  $\beta$ -ecdisona (20E), ecdisteroide de interesse, vem sendo realizada principalmente nas raízes (Iarema, 2008).

Nesse experimento, as mesmas condições foram estabelecidas para todos os tratamentos garantindo que a diferença genética e a interação planta nematoide influenciaram o desenvolvimento das plantas. Visto que variações no teor de  $\beta$ -ecdisona presentes em diferentes acessos de *P. glomerata* são atribuídas, principalmente, à variabilidade genética das plantas, a condições ambientais de cultivo e até mesmo diferenças na metodologia de análise (Magalhães, 2000; Corrêa Jr., 2003; Figueiredo et al., 2004).

A parte aérea da planta está diretamente associada à produção dos compostos de interesse da espécie, seja por indução de estímulos ou mesmo como local de síntese (Iarema, 2008). O teor de  $\beta$ -ecdisona (20E %), na parte aérea de *P. glomerata* se manteve estável e semelhante em todas as concentrações do inóculo, enquanto que, nas raízes foram observadas alterações no padrão de produtividade de acordo com o tratamento e concentração dos ovos inoculados. Esses dados corroboram com resultados obtidos por Iarema (2008), a qual verificou o mesmo padrão de resposta para os acessos infestados com nematoides.

Os resultados observados para o teor de  $\beta$ -ecdisona (20E %), nos sistemas radiculares de ambos os acessos sugere que há comunicação sistêmica, mesmo quando separados espacialmente na mesma planta, pois o aumento no teor do princípio ativo ocorreu concomitante ao tratamento que continha o inóculo de ovos de nematoide de *M. incognita* e o tratamento sem a presença desses. Além disso, a presença do inóculo estimulou o aumento do teor de 20E, principalmente quando adicionado nas concentrações de 30.000 ovos vaso<sup>-1</sup>.

O estímulo ao aumento no teor de  $\beta$ -ecdisona pode estar relacionado à resposta química da planta ao ataque dos nematoides (Carneiro et al., 2007), pois este composto é induzido por insetos e nematoides (Soriano et al., 2004). Em espinafre, o acúmulo de ecdisteroides nas raízes foi induzido por insetos (Schmelz et al., 1999) ou por danos

mecânicos (Schmelz et al., 1998). Associado às características genéticas, estes fatores podem ter contribuído diretamente na maior produção do princípio ativo (Iarema, 2008).

Raízes de *P. glomerata*, não infectadas por nematoide, apresentaram teores de  $\beta$ -ecdisona compatíveis com o padrão de variação (0,15% - 0,76%) observado por diversos autores em diferentes acessos e condições de cultivo (Montanari Jr. et al., 1999; Corrêa Jr., 2003; Figueiredo et al., 2004; Freitas et al., 2004; Marques et al., 2004; Guerreiro, 2006; Kamada, 2006; Zimmer et al., 2006, Iarema, 2008, Flores et al., 2010). Em amostras comerciais o teor de  $\beta$ -ecdisona flutua entre 0,3-0,5% (Figueiredo et al., 2004). Entretanto, tais teores foram observados em plantas mais velhas (aproximadamente 12 meses) comparadas às utilizadas nesse experimento (90 dias), comprovando que a interação fáfia-nematoide pode ser vantajosa comercialmente ao produtor, em decorrência dessas elevações de teores do princípio ativo de interesse.

Além disso, foi relatado que o acúmulo do teor de 20E ocorre durante a vida da planta variando durante a ontogenia (Festucci-Buselli, 2008; Dinan et al., 2009). Nesse sentido, sugerem-se, em trabalhos futuros, o uso de plantas de fáfia mais velhas com aumento da concentração de ovos vaso<sup>-1</sup>, visando obter maior acúmulo de  $\beta$ -ecdisona.

O metabolismo secundário das plantas manifesta-se em células e tecidos específicos em determinados estádios do seu crescimento e desenvolvimento, sugerindo íntima correlação entre crescimento e diferenciação morfológica das células (Rocha & Campo, 2004).

Carneiro et al. (2007) apontaram aumento relativo de 20E nas raízes de *P. glomerata* infectadas por nematoides, associando ao fato de que o nematoide reduziu significativamente a massa fresca das raízes parasitadas. Essa característica não ocorreu em nosso experimento, pois as maiores massa seca (média de 4,01 g) ocorreram nas raízes inoculadas.

As interações entre plantas hospedeiras e nematoides são complexas, pois resultam em mudanças morfológicas e de desenvolvimento em ambos os organismos (Williamson & Hussey, 1996). Ao perfurar as células com seu estilete, o nematoide introduz o produto de suas glândulas esofagianas o que incita o surgimento das células gigantes, localizadas geralmente no cilindro vascular as quais fornecem nutrientes essenciais para seu desenvolvimento (Jones, 1981). Estas células gigantes exibem generalizado aumento da atividade enzimática, comparado às células adjacentes (Gommers & Dropkin, 1977). Além disso, contêm mais proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos do que células normais (Bird, 1961).

As células gigantes e as galhas são respostas distintas a um mesmo evento, independente da injeção de secreções produzidas pelas glândulas esofagianas do nematoide em células das raízes da planta hospedeira. As células gigantes são essenciais ao desenvolvimento e reprodução do parasito, porém as galhas não. As galhas, na verdade, constituem apenas bons indicadores da extensão das reações hiperplástica e hipertrófica dos tecidos afetados pelas secreções, podendo ser formadas bem antes que as células gigantes e mesmo na ausência dessas (Ferraz, 2001).

Iarema (2008) verificou a presença de galhas no acesso 22 e ausência no acesso 43, sugerindo então a tolerância e a resistência a nematoides, respectivamente. Entretanto, plantas são definidas como resistentes a nematoides quando esses reduzem seus níveis de reprodução (Williamson & Hussey, 1996). Nesse trabalho, as quantidades observadas de ovos e galhas em ambos os acessos sugerem a tolerância a nematoide dos dois acessos, visto que tanto o AC 22 quanto o AC 43 apresentaram quantidade grande de ovos alojados ao longo de suas raízes.

Carneiro et al. (2005) estudaram o mecanismo de resistência em genótipos de algodoeiro a *M. incognita* mediante a histopatologia comparada entre cultivar resistente e tolerante. Embora os nematoides tenham penetrado nas raízes, em ambos os genótipos, falharam no estabelecimento e manutenção das células gigantes, resultando em baixa reprodução nos genótipos resistentes. Esse fato não foi observado no AC 43, pois embora não apresentasse galhas o fator de reprodução dos nematoides foi maior que 1,0. Adicionalmente, a análise estrutural revelou a presença de células gigantes no sistema radicular.

Gomes (2006) estudou a resistência e a caracterização histológica de um acesso resistente e outro suscetível de *Pfaffia glomerata* a *M. incognita*. As observações histológicas das raízes infectadas suscetíveis demonstraram que os nematoides penetraram, migraram e se desenvolveram, nem sempre pela região de alongamento, porém nas raízes infectadas resistentes, as células gigantes eram menores, em menor número e mal formadas. Adicionalmente, aos 39 dias, fêmeas não foram observadas, o que confirmou o baixo fator de reprodução (menor que 1) do acesso resistente. A presença de fêmeas em contato com o sítio de alimentação caracteriza a eficiência para a nutrição do nematoide, pois deve haver de cinco a nove células gigantes por sítio de alimentação para que ocorra o perfeito desenvolvimento do nematoide (Westerich, 2009).

De forma geral, para ambos os acessos, o córtex radicular apresentou-se com células do parênquima hipertrofiadas e hiperplásticas, sem a presença de células gigantes, enquanto o cilindro vascular encontrou-se desorganizado e com presença de células gigantes. Estas observações corroboram com outros pesquisadores (Gomes, 2006; Das et al., 2008; Westerich, 2009).

A superfície da cutícula do nematoide é uma estrutura dinâmica e exerce funções fisiológicas importantes como: locomoção, início de muda, nutrição, resistência para desidratação e proteção física, além disso, contém proteínas, carboidratos e lipídios (Curtis, 2007). Tal fato correlaciona com as reações positivas dos corantes histoquímicos que demonstraram resultados positivos.

Os nematoides das galhas secretam proteínas que capacitam o parasito a regular, direta ou indiretamente, genes hospedeiros específicos para a formação das células gigantes (Hussey, 2010). Entretanto, embora a histoquímica tenha demonstrado maior detecção proteica nas regiões de localização dos nematoides, a análise de proteínas totais não foi efetiva quanto a essa caracterização uma vez que, à excessão do tratamento com concentração de 6.000 ovos vaso<sup>-1</sup>, a presença do inóculo não produziu o aumento da expressão proteica. Esse fato pode estar relacionado ao método escolhido para detecção das proteínas totais (Bradford, 1976), pois detectam somente moléculas de proteínas com 8-9 ligações peptídicas o que pode ter subestimado as concentrações de proteínas.

Compostos fenólicos circundando a formação das células gigantes indicam a resposta da planta à inoculação do nematoide, pois para se adaptarem às diferentes adversidades do ambiente, as plantas possuem mecanismos de defesa inativos ou latentes, que são ativados quando expostas a um agente eliciador (Antunes, 2008). Esse agente pode ser biótico, como o nematoide, ou abiótico, como temperatura ou estresse mecânico. Ainda, o acúmulo de compostos eletrodensos nas células parenquimáticas corticais e vasculares sugere que os fenólicos estão envolvidos na defesa das plantas ao ataque de nematoides (Valette et al., 1998).

De forma geral, a produção das enzimas indicadoras do estado de indução à resistência de plantas, com a combinação dos acessos e a presença do nematoide inoculado em cada vaso, demonstrou haver desativação parcial da via de controle oxidativo, bem como da via de síntese constitutiva de compostos fenólicos e de quitinases.

A atividade de peroxidases (POD) na parte aérea do acesso 43 foi maior no tratamento 12.000 ovos vaso<sup>-1</sup> mesmo tratamento que apresentou maior quantidade de ovos e galhas encontrados, indicando a maior concentração do organismo vivo. A presença de nematoides desativou parcialmente a via de controle oxidativo, no acesso 22, porém a reativação dessa via foi observada no tratamento 30.000 ovos vaso<sup>-1</sup>, provavelmente para controlar o excesso de população. Além disso, o estresse provocado por um agente induz a defesa tanto na região diretamente em contato com esse agente (resposta local), quanto em áreas distantes (resposta sistêmica) (Antunes, 2008), o que explica a ativação enzimática na parte aérea de ambos os acessos, em concentrações distintas e nos diferentes tratamentos.

A peroxidase catalisa diversas reações metabólicas envolvidas no crescimento e desenvolvimento vegetal, e em mecanismos de defesa como a lignificação, cicatrização de ferimentos e a oxidação de compostos fenólicos (Baysal et al., 2003). Essa categoria de enzimas se destaca como importante componente de resposta a estresses em plantas, e parecem correlacionar-se com aumento quando infectadas por nematoides (Ibrahim, 1991), mas também podem atuar regulando os níveis de peróxido de hidrogênio nos tecidos das plantas, com o envolvimento com a produção de superperóxido e peróxido de hidrogênio (Malolepza & Urbanek, 2000). A atividade da peroxidase em extratos de fêmeas adultas de *Meloidogyne incognita* foi influenciada pela planta hospedeira, nos quais os nematoides foram propagados. Extratos de nematoides propagados em tabaco apresentaram 56% de atividade da peroxidase em relação aos extratos oriundos de tomate (Hussey & Sasser, 1973).

A expressão contínua, nos diferentes tratamentos, de PAL nas raízes do acesso 22 indicou que esse acesso não possuía a via de síntese constitutiva de síntese de compostos fenólicos. Entretanto, como houve atividade detectada somente no tratamento controle do acesso 43, a infecção por nematoides promoveu a desativação da via de síntese constitutiva de compostos fenólicos.

Enzimas podem interagir com reguladores de crescimento e fenóis resultando na expressão de suscetibilidade ou resistência (Premachandran & Dasgupta, 1983). Arfaoui et al. (2007) e Jaiti et al. (2007) relataram o aumento da atividade de fenilalanina amônia liase (PAL) na resistência de plantas a nematoides. Os compostos fenólicos apresentam diversas funções nos vegetais e a classe mais abundante é a derivada da fenilalanina. A PAL, enzima-chave na rota dos fenilpropanoides, está relacionada com mecanismos de defesa contra patógenos, sendo responsável pela desaminação da L-

fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia. O ácido *trans*-cinâmico é incorporado em diferentes compostos fenólicos, dando origem a fitoalexinas, compostos antimicrobianos intimamente associados à resistência de plantas a patógenos (Wuyts et al., 2006; Arfaoui et al., 2007).

A ativação de quitinases foi mais expressada nos tratamentos controle (sem a presença do inoculado), em ambos os acessos. As quitinases e as  $\beta$ -1-3-glucanases são induzidas quando as plantas respondem a processos de ferimentos, infecção por fungos, bactérias ou vírus patogênicos, catalisando reações de quitina (Antunes, 2008), não por nematoides. Portanto, a resposta à redução após a infecção por nematoides indica que a presença destes patógenos desativa a via de síntese de quitinases em fáfia.

Nesse trabalho foi observado que a presença dos nematoides desativou a atividade de resistência no acesso 43, o que parece estar associado à proteção aos ovos, caracterizando esse acesso como tolerante aos nematoides.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R.B.N. **Caracterização morfológica, química e conservação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen**. Tese Doutorado - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp. 129p., 2008.

ANTUNES, P. W. P. **Proteômica e peptidômica aplicadas ao estudo da defesa de plantas de tomate à injúria mecânica**. (Dissertação em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, MG. 119p, 2008.

ARAÚJO, W. P; MATTOS, J.K.A.; SOUZA, R.M. Fontes de resistência a *Meloidogyne javanica* entre procedências de *Pfaffia glomerata*. **Fitopatologia Brasileira**, 19:322-323, 1994.

ARFAOUI, A.; EL HADRAMI, A.; MABROUK, Y.; SIFI, B.; BOUDABOUS, A.; EL HADRAMI, I.; DAAYF, F.; CHÉRIF, M. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45:470-479, 2007.

BALTAEV, U.A. Phytoecdysteroids: structure, sources, and biosynthesis in plants. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, 26:799-831, 2000.

BAYSAL, O.; SOYLU, E. M.; SOLYU, S. Induction of defense-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* **Plant Pathology**, 52:747-753, 2003.

BIRD, A. The ultrastructure and histochemistry of a nematode-induced giant cell. **The Journal of Biophysical and Biocitochemical Cytology**, 11:701-715, 1961.

BONETI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, 6:553, 1981.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248-254, 1976.

CARNEIRO, R.M.D.G.; MESQUITA, L.F.G.; CIROTTO, P.A.S.; PEREIRA, S.I.V.; PEREIRA, P.S.; SILVA, D.B.; VIEIRA, R.F. Resistência de genótipos de algodoeiro a *Meloidogyne incognita* raça 3: reprodução e histopatologia. **Nematologia Brasileira**, 29:1-10, 2005.

CARNEIRO, R.M.D.G.; MESQUITA, L.F.G.; CIROTTO, P.A.S.; PEREIRA, S.I.V.; PEREIRA, P.S.; SILVA, D.B.; VIEIRA, R.F. Detecção de *Meloidogyne* spp. em *Pfaffia* spp. no Distrito Federal e patogenicidade de *M. javanica* a *Pfaffia glomerata* e *P. paniculata*. **Nematologia Brasileira**, 30:159-163, 2007.

CORRÊA JR., C. **Estudo agrônômico de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]: sazonalidade na produção de raízes e teors de  $\beta$ -ecdisona em diferentes acessos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul.** Tese de doutorado (Horticultura). UNESP/Botucatu, 96p., 2003.

COUTINHO, I.D.; CARDOSO, C.A.L.; VIEIRA, M.C; RAMOS, M.B.M. Análise da presença de  $\beta$ -ecdisona e do perfil cromatográfico das raízes, flores e galhos de *Pfaffia glomerata* cultivada com 18 meses. **Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC - Fortaleza, CE - Julho/2005.**

CURTIS, R. H. C. Plant parasitic nematode proteins and the host-parasite interaction. **Briefings in functional genomics and proteomics.** 6: 50 -58, 2007.

DAS, S.; DEMASON, D. A.; EHLERS, J. D.; CLOSE, T. J.; ROBERTS, P. A. Histological characterization of root-knot nematode resistance in cowpea and its relation to reactive oxygen species modulation. **Journal of Experimental Botany**, 59: 1305–1313, 2008.

DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, 57:325-339, 2001.

DINAN, L.; HARMATHA, J.; VOLODIN, V.; LAFONT, R. Phytoecdysteroids: Diversity, Biosynthesis and Distribution. In: Guy Smagghe (Editor) **Ecdysone: Structures and Functions**, ISBN 978-1-4020-9111-7, Springer, Chapter 1; 43 p., 2009.

FABRY, C. F. S. **Indução de resistência ao nematoide das galhas (*Meloidogyne spp.*) em tomateiro por rizobactérias** (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, MG. 73p, 2006.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J. F. V. (Org.). **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja.** Londrina: EMBRAPA Soja; Sociedade Brasileira de Nematologia, 15-38, 2001.

FESTUCCI-BUSELLI, R.A. **Accumulation pattern of the phytoecdysteroid 20-hydroxyecdysone in different organs of *Pfaffia glomerata*.** (Doutorado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, MG. 83p, 2008.

FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; OTONI, W.C. Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone – a review. **Botany**, 86: 978-987, 2008a.

FESTUCCI-BUSELLI, R.A., CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; VIEIRA, R.F.; OTONI, W.C. Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. 20(4): 305-307, 2008b.

FIGUEIREDO, L.S.; TEIXEIRA, S.L.; FREITAS, S.P.; VIEIRA, I.J.C.; MARTINS, E.R. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen

(Amaranthaceae) nas condições de Campos dos Goytacazes – RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 7:67-72, 2004.

FLORES, R; BRONDANI JR, D; CEZAROTTO Jr , V.; GIACOMELLI, S. R. ;NICOLOSO, F. T. Micropropagation and  $\beta$ -ecdysone content of the Brazilian ginsengs *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa*. **In Vitro Cellular et Developmental Biology-Plant**, 46(2):210-217, 2010.

FREITAS, C.S.; BAGGIO, C.H.; SILVA-SANTOS, J.E.; RIECK, L.; SANTOS, C.A.M.; CORRÊA JUNIOR, C.; MING, L.C.; CORTEZ, D.A.G.; MARQUES, M.C.A.. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, 74:1167-1179, 2004

GERLACH, D. **Botanische Mikrotechnik**. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 311p., 1984.

GOMES, A.C.M.M. **Resistência e caracterização histológica de acessos de *Pfaffia glomerata* a *Meloidogyne incognita***. (Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 73 p., 2006.

GOMMERS, F.J.; DROPKIN, V.H. Quantitative histochemistry of nematode-induced transfer cells. **Phytopathology**, 67: 869-873, 1977.

GUERREIRO, C.P.V. **Análise de crescimento, curva de absorção de macronutrientes (N, P e K) e teor de  $\beta$ -ecdisona em fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen): em função de adubação orgânica**. Mestrado (Agronomia/Horticultura), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 124p., 2006.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, 20:73-80, 1982.

HUSSEY, R. S. Go Where the Science Leads You. **Annual Review of Phytopathology**. 2010.

HUSSEY, R.S. & SASSER, J.N. Peroxidase from *Meloidogyne incognita*. **Physiological Plant Pathology**, 3: 223-226, 1973.

IAREMA, L. **Enxertia e propagação *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. (Tese de Doutorado Botânica) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 191p., 2008.

IBRAHIM, S. K. Peroxidase isoenzymes from *Meloidogyne* spp. cultured on different hosts. **Revue Nématologie**, 14:335-344, 1991.

JAITI, F. MEDDICH, A.; EL HADRAMI, I. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against bayoud disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 71:166-173, 2007.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. Mc Graw-Hill Book Co. Inc., New York. 523p., 1940.

JONES, M. G. K. Host cell responses to endoparasitic nematode attack: structure and function of giant cells and syncytia. **Annals of Applied Biology**, 97:353-372, 1981.

KAGIKI, F.O.; GONÇALVES, G.C.; OLIVEIRA, E.T.; CROCOMO, O.J.; GALLO, L.A. Indução de calos e produção de saponinas totais em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 7:43-50, 2004.

KAMADA, T. **Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] por RAPD, caracteres morfológicos e teor de  $\beta$ -ecdisona**. (Tese de Doutorado Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 106p., 2006.

LAFONT R., HARMATHA J., MARION-POLL F., DINAN L., WILSON I.D. 2002. **The Ecdysone Handbook**, 3rd edition, online, <http://ecdybase.org>.

LEVER, M. A New reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, 47:273-279, 1972.

MAGALHÃES, P.M. Agrotecnología para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTÍNEZ, J.V.; BERNAL, H.Y.; CÁCERES, A. **Fundamentos de Agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Colombia: Convenio Andres Bello e CYTED (Serie Ciencia Y Tecnología, Nº 83). p. 323-332, 2000.

MAIA, V. **Técnicas histológicas**. Atheneu, São Paulo. 1979.

MAKKA, T.; SEINO, A.; TOMITA, S.; FUJUWARA, H.; SONOBE, H. A possible role of 20-hydroxyecdysone in embryonic development of the silkworm *Bombyx mori*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 51:111-120, 2002.

MAŁOLEPSZA, U.; URBANEK, H. The oxidants and antioxidant enzymes in tomato leaves treated with o-hydroxyethylrutin and infected with *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, 106: 657-665, 2000.

MARQUES, L.C.; GALVÃO, S.M.P.; ESPÍNOLA, E.; DIAS, R.F.; MATTEI, R.; OLIVEIRA, M.G.M.; CARLINI, E.L.A. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (Extract BNT-08) in rodents. **Phytotherapy Research**, 18:566-572, 2004.

MONTANARI JR., I.; MAGALHAES, P.M.; QUEIROGA, C. L. Influence of plantation density and cultivation cycle on root productivity and tenors of b-ecdysone in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta Horticulturae**, 502:125-128, 1999.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; MARTINS, C.F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 3:11-18, 2001.

NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; FUJINO, M.; INOUE, S-S.; TAKEMOTO, T.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G.; TANAKA, O.; KASAI, R.; MATSUURA, H. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some <sup>13</sup>CNMR chemical shifts. **Phytochemistry**, 26:2505-2507, 1987.

NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; FUJINO, M.; TAKEMOTO, T.; YEOH, C.L.; OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. Three ecdysteroid glycosides from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochemistry**, 27:1665-1668. 1988.

O'BRIEN, T.P.; McCULLY, M.E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne – Australia: Termarcarphi Pty Ltd., 45 p., 1981.

PASCHOLATI, S.F.; NICHOLSON, R.L.; BUTLER, L.G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. **Journal of Phytopathology**, 115:165-172, 1986.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 14<sup>a</sup> Edição, 477 p., 2000.

PREMACHANDRAN, D.; DASGUPTA, D.R. A theoretical model for plant-nematode interaction. **Revue Nématologie**, 6: 311-314, 1983.

ROCHA, F.S.; CAMPOS, V.P. Efeito de exsudatos de cultura de células de plantas em juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, 29, 2004.

SAVCHENKO, T.; WHITING, P.; SARKER, S.D.; DINAN, L. Distribution and identity of phytoecdysteroids in *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 26:337-346, 1998.

SCHMELZ, E.A.; GREBENOK, R.J.; GALBRAITH, D.W.; BOWERS, W.S. Damage-induced accumulation of phytoecdysteroids in spinach: a rapid root response involving the octadecanoic acid pathway. **Journal of Chemical Ecology**, 24:339-360, 1998.

SCHMELZ, E.A.; GREBENOK, R.J.; GALBRAITH, D.W.; BOWERS, W.S. Insect-induced synthesis of phytoecdysteroids in spinach, *Spinacia oleracea*. **Journal of Chemical Ecology**, 25:1739-1757, 1999.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; KATO, K.; NISHIGUCHI, Y.; TAKEMOTO, T.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. 1993. Pfaffane-type nortriterpenoids from *Pfaffia pulverulenta*. **Phytochemistry**, 33:897-899.

SORIANO, I.R.; RILEY, I.T.; POTTER, M.J.; BOWERS, W.S. Phytoecdysteroids: a novel defense against plant-parasitic nematodes. **Journal of Chemical Ecology**, 30:1885-1898, 2004.

STAT SOFT. INC. **STATISTICA (data analysis software system)**. Version 7. www.statsoft.com., 2004.

STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, 35: 235-270, 1997.

THOMPSON, S.E.; SMITH, M.; WILKINSON, M.C.; PEEK, K. Identification and characterization of a chitinase antigen from *Pseudomonas aeruginosa* Strain 385. **Applied and Environmental Microbiology**, 67:4001-4008, 2001.

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*. **Phytopathology**, 88: 1141-1148, 1998.

WILLIAMSON, V.M.; HUSSEY, R.S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **The Plant Cell**, 8:1735-1745, 1996.

WESTERICH, J. N. **Estudo do ciclo biológico de *Meloidogyne mayaguensis* e das alterações histopatológicas causadas por essa espécie em raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicon* L.)**. (Dissertação em Agronomia – Proteção de Plantas), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP. 85p, 2009.

WUYTS, N.; MAUNG, Z.T.Z.; SWENNEN, R.; WAELE, D. Banana rhizodeposition: characterization of root border cell production and effects on chemotaxis and motility of the parasitic nematode *Radopholus similis*. **Plant and Soil**, 283:217–228, 2006.

ZIMMER, A.R.; BRUXEL, F.; BASSANI, V.L.; GOSMANN, G. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 40:450-453, 2006.

## CAPÍTULO II

### **Interação entre acessos de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] e *Meloidogyne incognita* e *M. javanica***

#### **RESUMO**

*Pfaffia glomerata* (fáfia), é uma planta endêmica das Américas, cuja importância advém do constituinte ativo  $\beta$ -ecdisona (20E), um importante esteroide empregado no desenvolvimento de fitoterápicos e fitocosméticos. Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador desta planta, porém existem fatores fitossanitários limitantes que podem prejudicar seu cultivo, como a presença de nematoides do gênero *Meloidogyne*. Entretanto, pesquisadores observaram que a presença desses nematoides resultou em aumento no teor de 20E em diferentes acessos de *Pfaffia*. Dessa forma, buscou-se analisar a interação dos acessos 2202-15 (acesso 22) e 2209-09 (acesso 43) de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] com a infecção por *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, abrangendo os aspectos fitoquímicos, anatômicos e histoquímicos. Foi observado haver interferência, como a competição entre os acessos de fáfia, e, a presença do nematoide influenciou a produção de 20E. Essa competição entre acessos promoveu menor tolerância dos acessos aos nematoides *M. incognita* e *M. javanica*. Análises anatômicas demonstraram que, principalmente no acesso 22 atacado por *Meloidogyne*, o cilindro vascular das raízes apresentou número elevado de células gigantes, multinucleadas, com citoplasma denso, bem como compressão de células do córtex e do cilindro vascular, devido à presença dos sítios de alimentação. Esses sítios resultaram na compressão dos elementos do xilema nos dois acessos avaliados, ainda que o acesso 43 tenha apresentado menor número de células gigantes ao longo do sistema radicular em comparação ao acesso 22. Dados confirmados também pelas análises de número de galhas e ovos dos nematoides. Os testes histoquímicos realizados indicaram reação positiva, da planta atacada pelo nematoide, tendo o controle menor intensidade de coloração para os corantes PAS, Sudan e xylydine Ponceau. As enzimas indicadoras do estado de indução à resistência de plantas, com a combinação dos acessos e presença do nematoide inoculado em cada vaso, apresentaram maior expressividade na parte aérea dos acessos e desativação parcial da via de controle oxidativo, bem como da via de síntese constitutiva de compostos fenólicos e quitinases.

## 1.- INTRODUÇÃO

*Pfaffia glomerata* (fáfia) é uma planta endêmica das Américas cuja importância advém do constituinte ativo  $\beta$ -ecdisona (20E) (Coutinho et al., 2005). Além da 20E, entre os principais constituintes isolados das raízes de *Pfaffia* estão relacionados estigmasterol, sitosterol, alantoína, ecdisteroides, triterpenoides e nortriterpenoides (Takemoto et al., 1983; Nakai et al., 1984; Nishimoto et al., 1984; 1988; Shiobara et al., 1992; 1993). Os ecdisteroides extraídos da *Pfaffia* são de interesse farmacológico com utilização no preparo de produtos cosméticos e dermatológicos, sendo  $\beta$ -ecdisona (20E) um importante esteroide empregado em formulações cosméticas (Cortez et al., 1998). O teor deste composto é frequentemente mensurado no cultivo e na seleção de genótipos (Magalhães, 2000; Corrêa Júnior, 2003; Figueiredo, 2004).

*P. glomerata* não é uma espécie domesticada. Uma única população pode demonstrar ampla variabilidade, seja associada às diferenças no desenvolvimento, na resistência a pragas e doenças, nas respostas à fertilidade do solo ou na produtividade, que pode ser expressa nas plantas com diferentes teors de constituintes bioativos, responsáveis pelos efeitos terapêuticos (Montanari Júnior, 2005; Montanari Júnior & Perecin, 2006).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador de *Pfaffia*. Entretanto, existem fatores fitossanitários limitantes que podem prejudicar o cultivo da fáfia (Carneiro et al., 2007), como a presença de nematoides do gênero *Meloidogyne*. No entanto, foi verificado que a infecção de diferentes acessos de *Pfaffia* por estes nematoides resultou no aumento do teor de 20E (Gomes, 2006; Carneiro et al., 2007; Alves, 2008; Iarema, 2008). Esta observação pode estar relacionada a uma interação entre o desenvolvimento do nematoide e a produção do princípio ativo na planta, visto que 20E é um análogo dos hormônios envolvidos na ecdise (Dinan, 2001; Festucci-Buselli et al., 2008; Dinan et al., 2009).

Pesquisas alelopáticas podem ser consideradas como componente fundamental na investigação nematológica, uma vez que a liberação dos compostos aleloquímicos pelas raízes está relacionada com o comportamento dos nematoides, sendo este de atração ou repulsão (Halbrendt, 1996). Entretanto, a alelopatia e competição ocorrem simultaneamente, tornando-se difícil separar esses mecanismos de interferência em nível de campo (Inderjit & Del Moral, 1997).

A interferência entre plantas pode ser basicamente de duas naturezas, a competição por fatores abióticos e a alelopatia que envolve fatores bióticos ou fatores químicos produzidos por outro indivíduo. A interferência por competição consiste na competição entre plantas e a influência de fatores ambientais como luz, água, temperatura, vento, pH e disponibilidade de nutrientes, ou ainda pela interação entre ambos (Ferreira & Borghetti, 2004). O metabolismo de defesa de uma planta pode modificar pela presença de plantas vizinhas, como o acúmulo de metabólitos secundários (Broz et al., 2010). Em *Pfaffia* ainda não existem resultados que façam inferência deste efeito no acúmulo de 20E.

Dessa forma, buscou-se analisar a interação dos acessos 22 e 43 de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] com *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* caracterizando a interferência e abrangendo os aspectos fitoquímicos, anatômicos e histoquímicos.

## **2.- METODOLOGIA**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT II), no Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides (BIONEMA) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), no Laboratório de Anatomia Vegetal, e no Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas do Centro de Ciências Biológicas (CCB II), na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

### **2.1 - Material Vegetal**

Os dois acessos utilizados de *P. glomerata* [acessos 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)] são procedentes de coleta em duas populações na bacia do rio Paraná, Brasil, e oriundas da coleção de germoplasma de plantas medicinais do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa/Cenargen).

Para estabelecimento do material estoque, utilizados para a montagem dos experimentos, os indivíduos (acessos) foram multiplicados vegetativamente *in vitro*, via segmento nodal, adaptando-se aos protocolos descritos por Nicoloso et al. (2001) e Kagiki (2004).

### **2.2 - Inoculações de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica***

Para a obtenção do inóculo utilizado nos experimentos, populações de *M. incognita* e *M. javanica* foram multiplicadas em raízes tomateiros cv. Santa Clara, em solo e areia na proporção de 1:1 (v/v) e mantidos em casa de vegetação. Posteriormente, os ovos foram extraídos pelo método de Boneti e Ferraz (1981) e a concentração determinada em lâminas de Peters ao microscópio óptico.

Plantas de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)] com 30 dias de cultivo, propagadas *in vitro*, via segmento nodal, foram cultivadas em hidroponia para a rustificação. Para o cultivo em hidroponia foram utilizados os macronutrientes:  $\text{KNO}_3$  (101,10 mg  $\text{dm}^{-3}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (27,11 mg  $\text{dm}^{-3}$ ),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (188,93 mg  $\text{dm}^{-3}$ ) e  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (42,56 mg  $\text{dm}^{-3}$ ), nos quais as plantas permaneceram por aproximadamente 15 dias.

Após este período, as plantas foram transferidas para vasos com capacidade de 1,5 L, e, então duas plantas “combinadas” foram mantidas em casa-de-vegetação com temperatura controlada a 28 °C. Nessa etapa, foi utilizado como substrato solo e areia na proporção de 1:1 (v/v). Foi utilizado o adubo «Ouro Verde» n° 3 (25% N total, 15% P2O5, 10% K2O, 0,7% B e 0,7% Zn), para fertilizar o solo (substrato) dos vasos aos 30 dias, após a transferência.

Os tratamentos consistiram de três combinações: duas plantas do acesso 2202-15 (AC 22); duas plantas do acesso 2209-09 (AC 43); uma planta do acesso 2202-15 (AC22) e uma do acesso 2209-09 (AC 43), por vaso. Entretanto, para análise foram consideradas quatro combinações, visto que as plantas foram analisadas separadamente conforme o tratamento. Após 15 dias da transferência, foram adicionados ao solo em suspensão aquosa ao redor da planta 10.000 ovos dos nematoides *M. incognita* ou *M. javanica* (Tabela 1).

**Tabela 1** - Códigos das combinações utilizadas para cada tratamento em vasos cultivados com plantas de *Pffafia glomerata* [acessos 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)].

Combinação	Planta analisada	Código	Tratamentos
22/22	22	22/22	CT ou MI ou MJ
43/43	43	43/43	CT ou MI ou MJ
22/43	22	22/43-22	CT ou MI ou MJ
22/43	43	22/43-43	CT ou MI ou MJ

Tratamentos: CT (controle); MI (*M. incognita*); MJ: (*M. javanica*).

Transcorridos 90 dias, após a infestação do solo, as seguintes variáveis foram avaliadas: massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular, número de galhas e número de ovos por sistema radicular. Foi determinado o teor do princípio ativo (20E), sendo esse analisado na parte aérea e nas raízes desenvolvidas em ambos os acessos. Da mesma forma foi analisada a atividade das enzimas indicadoras do estado de indução a resistência de plantas e, amostras dos sistemas radiculares foram coletadas e fixadas para as análises estruturais e histoquímica.

### **2.3 - Análises químicas**

A determinação do teor de  $\beta$ -ecdisona (20E) foi quantificada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), analisando-se amostras de massa seca das raízes e da parte aérea, obtidas por extrato metanólico. Utilizou-se o método descrito por Kamada (2006), e o material processado acondicionado em freezer (-20 °C).

As amostras foram preparadas a partir de 100 mg de material vegetal para 10 mL de metanol, as quais ficaram armazenadas em temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), durante oito dias, sob agitação diária do extrato. Após esse período, os extratos foram centrifugados (15 minutos/5.000 rpm) e o sobrenadante coletado. Depois de obtido o extrato metanólico, foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando as seguintes condições: equipamento da Shimadzu modelo LC-10AI, equipado com detector SPD-10AI, CBM-10A; coluna Bomdesil C 18 ( $5,0 \mu\text{m} \times 4,6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ); fase móvel metanol (100 %) com fluxo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ; volume de amostra injetada de  $20 \mu\text{L}$ ; leitura em  $\lambda = 245 \text{ nm}$ ; e tempo médio de corrida das amostras de raízes foi de 10 minutos. Para as amostras da parte aérea, a fase móvel foi composta por metanol-água na proporção 50:50 (v/v), com fluxo de  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$  e tempo de corrida da amostra de 15 minutos. Os dados foram integrados por meio do "software" Shimadzu LC10.

A curva de calibração foi obtida com padrão de 97% de pureza de  $\beta$ -ecdisona (Sigma Chem. Co., EUA), em concentrações de 10, 40, 60, 80, 90, 100, 120 e 200 mg  $\text{L}^{-1}$  metanol, os quais foram injetados ( $20 \mu\text{L}$ ). Os valores obtidos nos cromatogramas, correspondentes às concentrações das amostras-padrão, foram plotados no gráfico e obtido a equação para cálculo do teor de  $\beta$ -ecdisona das amostras.

### **2.4 - Determinações de galhas e ovos**

As plantas foram retiradas dos vasos, a parte aérea removida e as raízes lavadas. O número de galhas e de ovos foi contado por sistema radicular. Para tal, as raízes infestadas foram submersas em, aproximadamente, 250 mL de hipoclorito de sódio a 0,5 %, durante três minutos sob agitação constante. Posteriormente, lavadas em peneiras granulométricas sobrepostas, sendo a superior de 100 'mesh' (com abertura de 0,074

mm) e a inferior de 500 'mesh' (com abertura de 0,025 mm). A suspensão retida na última peneira foi recolhida em tubos de ensaio (25 x 150 mm) e a contagem do número de ovos realizada com o auxílio de câmara de Peters, em lupa estereoscópica.

Para análises relativas aos nematoides foi considerada metade da amostra do sistema radicular de cada tratamento, visto que a outra porção foi lavada e submetida à secagem em estufa de ventilação forçada e destinada à análise química.

## **2.5 - Análises estruturais e histoquímica**

Amostras das raízes foram fixadas em FAA 50 (formol + ácido acético + álcool 50%), por 24 horas, e estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940). Posteriormente, desidratadas em série etílicas e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Cortadas transversalmente em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA), com utilização de navalhas de vidro descartáveis. Os cortes (8 µm de espessura) foram corados com Azul de Toluidina pH 4,0 (O'Brien e McCully 1981) para caracterização estrutural, e as lâminas montadas em Permount. Para evidenciar a presença de compostos secundários foram utilizados: floroglucina (Johansen, 1940) para lignina; vermelho de rutênio (Johansen, 1940) para pectinas, PAS (Maia, 1979) para carboidratos, sudan (Gerlach, 1984) para lipídios, lugol (Johansen, 1940) para amido e xylidine Ponceau (O'Brien e McCully 1981) para proteínas.

Todas as lâminas foram examinadas e fotografadas em fotomicroscópio (modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) equipado com o sistema U-Photo.

## **2.6 - Detecções da atividade das enzimas indicadoras do estado de indução a resistência de plantas**

Para as determinações das atividades de enzimas lipoxigenases, peroxidases, fenilalanina amônia-liase, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases 5 g de folhas e raízes foram maceradas em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo. O pó obtido foi homogeneizado com polivinilpirrolidona (PVPP) 2%, e em seguida, com tampão extrato Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, (extração 1:3 g:mL), acrescido de fluoreto de

fenilmetilsulfonila (PMSF) e benzamidina, ambos na concentração final de 1 mM. O extrato obtido foi centrifugado a 20.000 g, 4 °C, por 25 minutos, e os sobrenadantes recolhidos.

### **2.7 – Determinações da concentração de proteínas totais**

A quantificação de proteínas totais foi feita utilizando o método de Bradford (1976). A absorbância foi medida em leitor de microplacas utilizando o comprimento de onda de 595nm. Para se determinar a concentração de proteínas, preparou-se uma curva-padrão com BSA (albumina soro bovina) como proteína padrão, entre 0 e 40 µg de BSA. A equação da reta da curva padrão ajustada foi  $y = 0,0865x + 0,0843$ , com  $R^2 = 0,9928$ . Foram utilizadas amostras em triplicata, contendo 20 µL cada.

### **2.8 - Detecções da atividade de Lipoxigenases (LOX)**

As atividades de LOX foram avaliadas segundo a metodologia descrita por Axerold et al. (1981), pelo aumento da absorvância no comprimento de onda de 234 nm, pela formação de um sistema de ligações duplas conjugadas no hidroperóxido formado, utilizando-se ácido linoleico (linoleato de sódio 10 mM, pH 9,0) como substrato. A mistura de reação constituirá de 1000 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, 20 µL do substrato e 10 µL do extrato vegetal. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a partir de 30 segundos do início da reação, e a 10 minutos e 30 segundos, após o início da reação.

A velocidade de formação dos produtos ( $V$ ) foi calculada pela equação:

$$V = \Delta A_{234} / \epsilon \cdot l \cdot \Delta t$$

Utilizando-se o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) dos hidroperóxidos para o ácido linoleico de  $25.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , o caminho ótico ( $l$ ), de 1,0 cm e o tempo de reação ( $\Delta t$ ). Os resultados finais da atividade enzimática foram expressos em µmol de 9-hidroperóxido do ácido linoleico.  $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g proteína}^{-1}$ : Atividade LOX (µmol/min.µg de ptn).

## 2.9 - Detecções da atividade de Peroxidases (PO)

A atividade das peroxidases foi determinada a 30 °C, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (Hammerschmidt et al., 1982). A mistura de reação constituiu de 1019 µL de uma solução de reação (constituída na proporção de 125 µL de guaiacol, 153 µL de peróxido de hidrogênio em 50 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0, e 1 µL do extrato vegetal). A reação foi incubada em banho-maria e, em seguida, foram realizadas as leituras de absorvância, no comprimento de onda de 470 nm, nos tempos de 30 segundos e 10 minutos e 30 segundos, após o início da reação. A atividade das peroxidases foi expressa em unidades de absorvância.min<sup>-1</sup>. µg proteína<sup>-1</sup> (U.A. min<sup>-1</sup>. µg proteína<sup>-1</sup>).

## 2.10 - Detecções de Fenilalanina Amônia-liase (PAL)

Para detecção da atividade de PAL, foi utilizado o método descrito por Pascholati et al. (1986), pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina, com pequenas modificações. Determinou-se a atividade por medida espectrofotométrica direta, pela conversão de L-fenilalanina para ácido cinâmico a 290 nm e 37 °C, nos tempos de 30 segundos, e seguido por 5 minutos e 30 segundos após o início da reação. A mistura de reação foi composta de 10 µL do extrato vegetal e 1.000 µL de uma solução 0,2% de L-fenilalanina. A variação (Δ) das leituras de absorvância foram plotadas em curva padrão para ácido cinâmico:

$$y = 0,3621x - 0,3891, R^2 = 0,9968$$

Em que y representa o valor da absorvância a 290 nm e x representa os nmoles de ácido cinâmico produzido. Os resultados foram expressos como atividade específica: nmol ácido cinâmico.min<sup>-1</sup>. µg proteína<sup>-1</sup>.

## 2.11 – Atividades de Quitinases

A atividade de quitinases foi avaliada pela variação colorimétrica do produto liberado na reação com o substrato *Chitin Azure*, na qual ocorre a liberação de fragmentos solúveis de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (CM-Chitin-RBV), segundo método descrito por Thompson et al. (2001). Uma massa de 50 µg do substrato foi utilizada em cada reação, constituindo uma concentração final do substrato de 1% (p/v) de mistura de reação.

*Chitin Azure* (50 µg) foi pesada em eppendorf com capacidade para 1 mL, seguido do acréscimo de 600 µL de tampão de extração e 400 µL do extrato vegetal. Na reação-controle, o extrato vegetal foi substituído por tampão de extração, no mesmo volume. Os ensaios foram incubados a 25 °C por 48 horas, em mesa agitadora orbital a 120 rpm. Em seguida a absorvância foi determinada.

Para o cálculo da atividade específica, utilizou-se a diferença entre o valor de absorvância de cada amostra e o valor de absorvância do controle. Os resultados finais foram expressos em atividade de quitinase.dia<sup>-1</sup>. µg quitina<sup>-1</sup>. µg proteína<sup>-1</sup>.

## 2.12 – Atividades de β-1,3-glucanases

A atividade de β-1,3-glucanases nas amostras foi determinada pela variação colorimétrica de glicose liberada do substrato laminarina usando hidrazina do ácido p-hidrobenczóico (HAPHB) (Lever, 1972). A mistura de reação foi incubada a 45 °C por 1 hora, contendo 220 µL do tampão de extração (acetato de sódio 10 mM, pH 5,0), 250 µL da solução de substrato (laminarina 4 mg.mL<sup>-1</sup>) e 30 µL do extrato vegetal. Após esse período, foram acrescentados 1,5 mL de HAPHB, solução de desenvolvimento de cor (0,5 g da HAPHB dissolvido em 10 mL de HCl 0,5M, acrescido de 50 mL de NaOH 0,5 M), sendo esta mistura, em seguida, aquecida a 100 °C por 5 minutos.

Após resfriamento em gelo até a temperatura de 30 °C determinou-se a absorvância das amostras, utilizando-se um comprimento de onda de 410 nm. O valor de absorvância de cada amostra foi subtraído pelo valor de absorvância do controle (correspondente à mistura idêntica à da amostra, porém sem incubação prévia). Os resultados foram expressos em unidades de absorvância. min<sup>-1</sup>. µg proteína<sup>-1</sup>.

### 2.13. - Análise estatística

Os experimentos foram realizados duas vezes, portanto, após Análise de Grupos de Experimentos (teste  $F_{\text{máximo}}$ ) (Pimentel-Gomes, 2000), optou-se por utilizar a média de ambos os experimentos conjuntamente. A determinação de galhas e ovos ocorreu em apenas 1/2 do sistema radicular completo, visto que a avaliação ocorreu com a retirada de 1/2 de raiz de cada vaso para as análises destrutivas.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 3 [quatro combinações de planta por vaso e três inoculações (controle, *M. incognita* e *M. javanica*)], com dez repetições por tratamento, sendo que cada unidade experimental foi constituída por uma planta (Tabela 1). Para as análises químicas foram utilizadas cinco repetições por tratamento. Os dados observados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e quando pertinente aplicado o teste de Tukey, utilizando-se o programa Statistica (Stat Soft, 2004).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 – Análises químicas

O teor de  $\beta$ -ecdisona (20E %) do sistema radicular de *P. glomerata* [acessos 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)], não diferiu de forma significativa pelo teste Tukey a 5% de significância, para os tratamentos (controle, *M. incognita* e *M. javanica*) ou para as combinações dos acessos (22/22; 43/43; 22/43-22; 22/43-43). Contudo, a interação entre ambos os tratamentos e combinações foi significativa, sendo a maior média obtida para o AC 22 sem a presença de ovos vaso<sup>-1</sup> de nematoide, e, a menor média ocorreu na combinação entre os acessos 22/43-43 (Tabela 2). A menor produção do princípio ativo 20E ocorreu quando os acessos foram combinados entre si, sendo o acesso 43 o que menos produziu 20E, comparado ao AC 22 (Tabela 2).

**Tabela 2** – Médias dos teores de  $\beta$ -ecdisona (20E %) no sistema radicular de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)], de acordo com a combinação dos acessos em cada vaso e os tratamentos [controle (CT) ou inoculado - 10.000 ovos vaso<sup>-1</sup> do nematoide *M. incognita* (MI) ou *M. javanica* (MJ)]

Tratamento	Combinação			
	22/22	43/43	22/43-22	22/43-43
CT	1,0618 aA*	0,6345 aB	0,8754 aAB	0,4817 aBC
MI	0,6985 cA	0,5762 aA	0,5951 bA	0,4655 aA
MJ	0,7843 bA	0,5406 aA	0,6954 bA	0,5507 aA

\*As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância. Letras minúsculas na vertical equivalem a diferenças entre os tratamentos e letras maiúsculas na horizontal equivalem a diferenças entre as combinações dos acessos.

Os resultados das médias do teor de 20E na parte aérea dos acessos de fáfia demonstraram que apenas a interação entre os tratamentos foi significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O AC 43 apresentou maior produção de 20E, tanto sem nematoide (CT) quanto com o nematoide *M. incognita* (MI); porém essa produção decresceu em presença do nematoide *M. javanica* (MJ). O AC 43 foi o melhor produtor na parte aérea, porém quando combinado com o acesso 22 diminuiu a concentração do teor de 20E. O inverso ocorreu no tratamento MI, pois na presença de nematoide a combinação de acessos aumentou o teor do princípio ativo (Tabela 3).

**Tabela 3** – Média do teor de  $\beta$ -ecdisona (20E %) na parte aérea de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)], de acordo com a combinação dos acessos em cada vaso e os tratamentos [controle (CT) ou inoculado - 10.000 ovos vaso<sup>-1</sup> do nematoide *M. incognita* (MI) ou *M. javanica* (MJ)].

Tratamento	Combinação			
	22/22	43/43	22/43-22	22/43-43
CT	0,3495 aB*	0,6537 aA	0,4214 aB	0,5393 aAB
MI	0,2309 aB	0,5403 aA	0,2506 aB	0,5222 aA
MJ	0,1861 aB	0,2253 bB	0,3981 aA	0,4855 aA

\*As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas na vertical equivalem a diferenças entre os tratamentos e letras maiúsculas na horizontal equivalem a diferenças entre as combinações dos acessos.

Sob inoculação de MI, o AC 43 acumulou mais 20E na parte aérea, enquanto sob ataque de MJ a competição entre genótipos parece ter sido benéfica quanto ao acúmulo de 20E para os dois genótipos.

Em termos gerais, o AC 22 foi o maior produtor de 20E no sistema radicular, porém o acesso 43 produziu mais 20E na parte aérea, independente do tratamento utilizado.

### 3.2 – Determinações de galhas, ovos e massa seca

A análise estatística para a variável número de galhas, do sistema radicular de *P. glomerata* acesso 22 e 43, demonstrou não haver diferença estatística, a 5% de significância pelo teste Tukey, nem para os tratamentos nem para as combinações, porém houve diferença estatística para a interação entre ambos os tratamentos e combinações. A presença do nematoide *M. javanica* promoveu maior formação de galhas, entretanto a maior quantidade de galhas em todos os tratamentos e combinação decorreu da presença do AC 22 (Tabela 4).

**Tabelas 4** – Médias do número de galhas nos sistema radicular de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)], de acordo com a combinação dos acessos em cada vaso e os tratamentos [controle (CT) ou inoculado - 10.000 ovos vaso<sup>-1</sup> do nematoide *M. incognita* (MI) ou *M. javanica* (MJ)]

Tratamento	Combinação			
	22/22	43/43	22/43-22	22/43-43
CT	0 bA*	0 aA	0 cA	0 bA
MI	149,8 aA	9,7 aB	114 bA	46,9 aB
MJ	216 aA	28 aB	163,9 aA	57,5 aB

\*As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas na vertical equivalem a diferenças entre os tratamentos e letras maiúsculas na horizontal equivalem a diferenças entre as combinações dos acessos.

Em relação à variável número de ovos do sistema radicular de *P. glomerata* acesso 22 e 43, a análise estatística demonstrou haver significância, a 5% de pelo teste Tukey, somente na interação entre os tratamentos e a combinação. A análise demonstrou haver uma quantidade maior de ovos no AC 22, mesmo quando combinado com o AC 43. Entretanto, a única diferença entre os tratamentos foi entre a presença ou não do agente inoculante (ovos de nematoide) (Tabela 5).

**Tabelas 5** – Médias do número de ovos no sistema radicular de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)], de acordo com a combinação dos acessos em cada vaso e tratamentos [controle (CT) ou inoculado - 10.000 ovos vaso<sup>-1</sup> do nematoide *M. incognita* (MI) ou *M. javanica* (MJ)]

Tratamento	Combinação			
	22/22	43/43	22/43-22	22/43-43
CT	0 bA*	0 bA	0 bA	0 bA
MI	474.639 aA	184.068,5 aB	455.031,5 aA	173.800 aB
MJ	591.976 aA	164.263 aB	439.274 aA	224.950 aB

\*As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas na vertical equivalem a diferenças entre os tratamentos e letras maiúsculas na horizontal equivalem a diferenças entre as combinações dos acessos.

Com ou sem a ocorrência de competição entre os acessos, MJ e MI foram igualmente eficientes em produzir ovos nos acessos de fáfia.

Tanto MJ como MI foram mais eficientes em produzir ovos no AC 22, independente da ocorrência de competição entre os genótipos.

Da mesma maneira que nas análises estatísticas anteriores, houve significância a 5%, pelo teste Tukey, somente na interação entre os tratamentos e a combinação. A análise demonstrou, de forma geral, que o AC 22 produziu menor acúmulo de massa seca, quando comparado ao AC 43, o qual produziu maior acúmulo de massa seca mesmo quando combinado com o AC 22 (Tabela 6).

**Tabela 6** – Massa seca (gramas) no sistema radicular de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)], de acordo com a combinação dos acessos em cada vaso e tratamentos [controle (CT) ou inoculado - 10.000 ovos vaso<sup>-1</sup> do nematoide *M. incognita* (MI) ou *M. javanica* (MJ)]

Tratamento	Combinação			
	22/22	43/43	22/43-22	22/43-43
CT	9,923 aB*	11,353 aAB	8,841 aC	10,27 aB
MI	8,649 bB	11,822 aA	8,551 aB	9,349 aB
MJ	9,189 aC	12,105 aA	8,87 aC	10,084 aB

\*As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas na vertical equivalem a diferenças entre os tratamentos e letras maiúsculas na horizontal equivalem a diferenças entre as combinações dos acessos.

Sob o ataque de nematoides, e a condução de um só acesso, o acesso 43 produziu mais matéria seca. Sob esse aspecto, observou-se que a competição entre os acessos 22 e 43 foi benéfica ao contornar de alguma forma o efeito do ataque de nematoides para o acesso 22.

### 3.3 – Análises estruturais e histoquímica

Não se observaram diferenças morfológicas e anatômicas, nas preparações histológicas entre as diferentes combinações utilizadas, bem como entre os tratamentos, diferindo somente na intensidade de coloração entre os controles (Fig. 1A) e a presença dos nematoides (Fig. 1B-F). Considerando esses aspectos, a Figura 1 representa aleatoriamente os acessos utilizados nesse estudo, de acordo com os testes empregados.

A análise estrutural dos acessos de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)], inoculados tanto com *M. incognita* quanto com *M. javanica*, demonstrou que o cilindro vascular das raízes do AC 22 apresentou número elevado de células gigantes, multinucleadas, com citoplasma denso, bem como compressão de células do córtex e do cilindro vascular, devido à presença dos sítios de alimentação em

desenvolvimento, os quais comprimiram inclusive os elementos do xilema, tendo o mesmo ocorrido no AC 43, porém com um menor número de células gigantes ao longo do sistema radicular, em comparação ao AC 22 (Fig. 1B).

As secções anatômicas indicaram uma desorganização das células do córtex com aumento da divisão das células corticais próximas ao nematoide, sendo estas de tamanho menor em relação às demais (Fig. 1B-D), a formação de compostos fenólicos durante a formação das células gigantes, enquanto o cilindro vascular sofria compressão (Fig. 1B).

A utilização do azul de toluidina permitiu verificar que próximo aos sítios de alimentação as células sofreram lignificação ou no momento da coleta permaneceram em processo de lignificação (Fig. 1B), porém testes com floroglucina não foram efetivos.

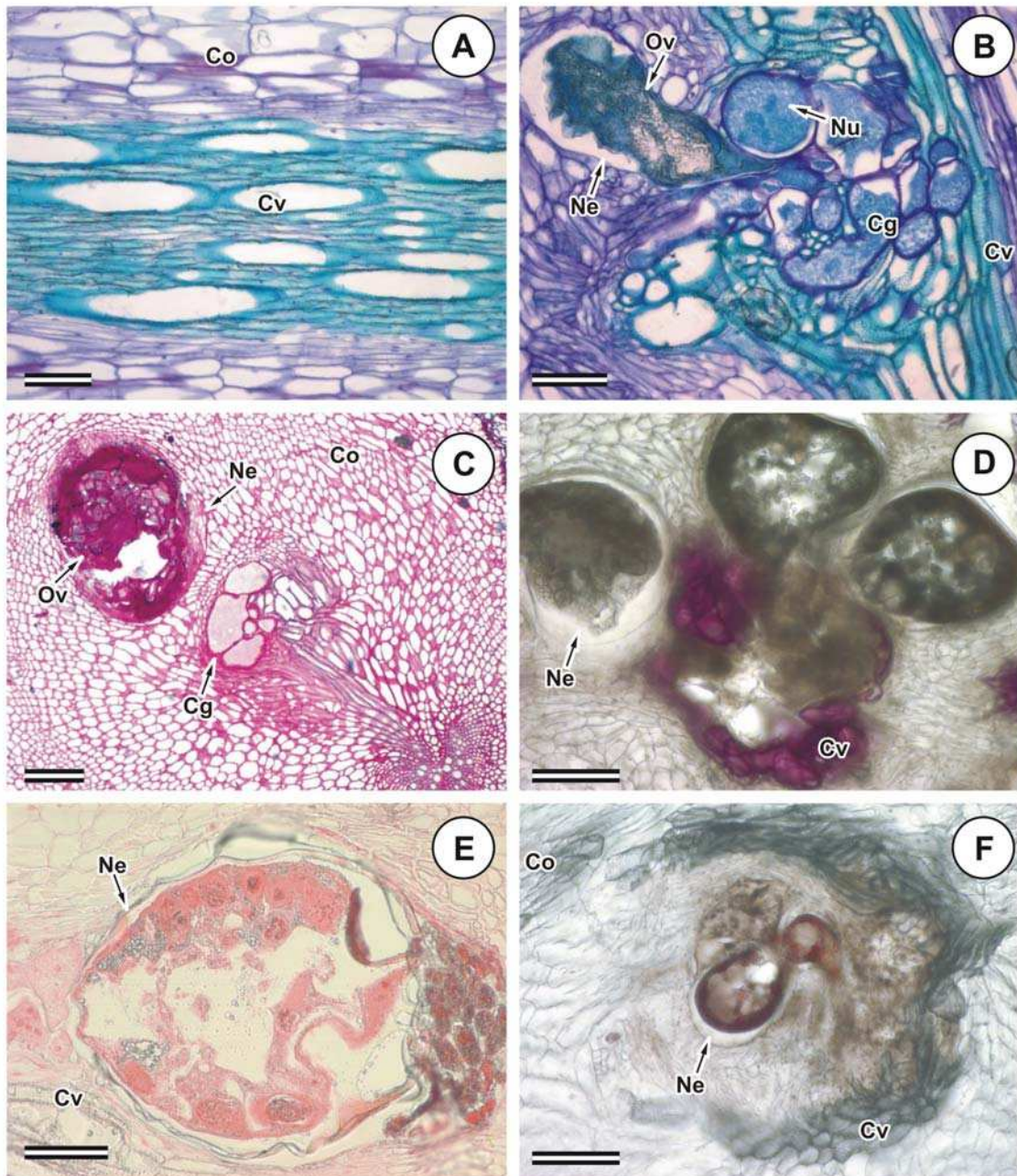
Massas de ovos também foram observadas em ambos os acessos (Fig. 1E -F).

Os testes histoquímicos realizados indicaram reação positiva para os corantes PAS, Sudan e Xylidine Ponceau (Tabela 9). Apresentando maior intensidade de coloração no corpo do nematoide (Fig. 1C-F), o corante PAS foi mais intenso em ovos de *Meloidogyne incognita* localizados no interior da fêmea madura (Fig. 1D). Por sua vez, o teste com xylidine Ponceau demonstrou maior intensidade do corante no corpo da fêmea, destacando a massa de ovos no seu interior (Fig. 1E). Já o teste com Sudan foi positivo somente no corpo da fêmea, com destaque para a massa de ovos (Fig. 1F).

**Tabela 9** - Testes histoquímicos efetuados nos acessos de *P. glomerata* [acessos 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)] encontrados no sistema radicular, de acordo com o tratamento aplicado.

Testes histoquímicos	Resultados
Floroglucina (lignina)	-
Vermelho de rutênio (pectinas)	-
PAS (carboidratos)	++
Sudan (lipídios)	+
Lugol (amido)	-
Xylidine Ponceau (proteínas)	++

Abreviações: (-) reação negativa; (+) reação positiva; e (++) reação positiva intensa.



**Figura 1** - Análise histoquímica do sistema radicular dos acessos de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)], inoculados com *M. incognita* e *M. javanica*. Secções longitudinais. **A:** controle corado com azul de toluidina; **B:** estabelecimento do sítio de alimentação, com presença da fêmea (nematóide); **C:** galha com teste com PAS, resultado positivo, maior intensidade do corante na fêmea; **D:** galha com teste Floroglucina, resultado negativo, somente cilindro vascular (xilema) corado; **E:** teste com xylidine Ponceae, maior intensidade do corante no corpo da fêmea; **F:** Teste com Sudan, teste positivo somente no corpo da fêmea, com destaque para a compressão do cilindro vascular. Barra: A; B, E= 100 µm; C, D, F = 200 µm. Legenda: Co = córtex, Cg = célula gigante, Ne = nematóide (Fêmea), Ov = ovos do nematóide, Cv= cilindro vascular, e, Nu=núcleo.

### **3.4 - Detecções da atividade das proteínas totais e das enzimas indicadoras do estado de indução a resistência de plantas**

Houve maior quantidade de proteínas totais expressadas nas raízes da maioria das combinações utilizadas, com destaque para as combinações CT22/22; CT22/43-43 e MJ 22/43-22, e a menor média ocorreu no tratamento CT43/43 (Fig. 2A).

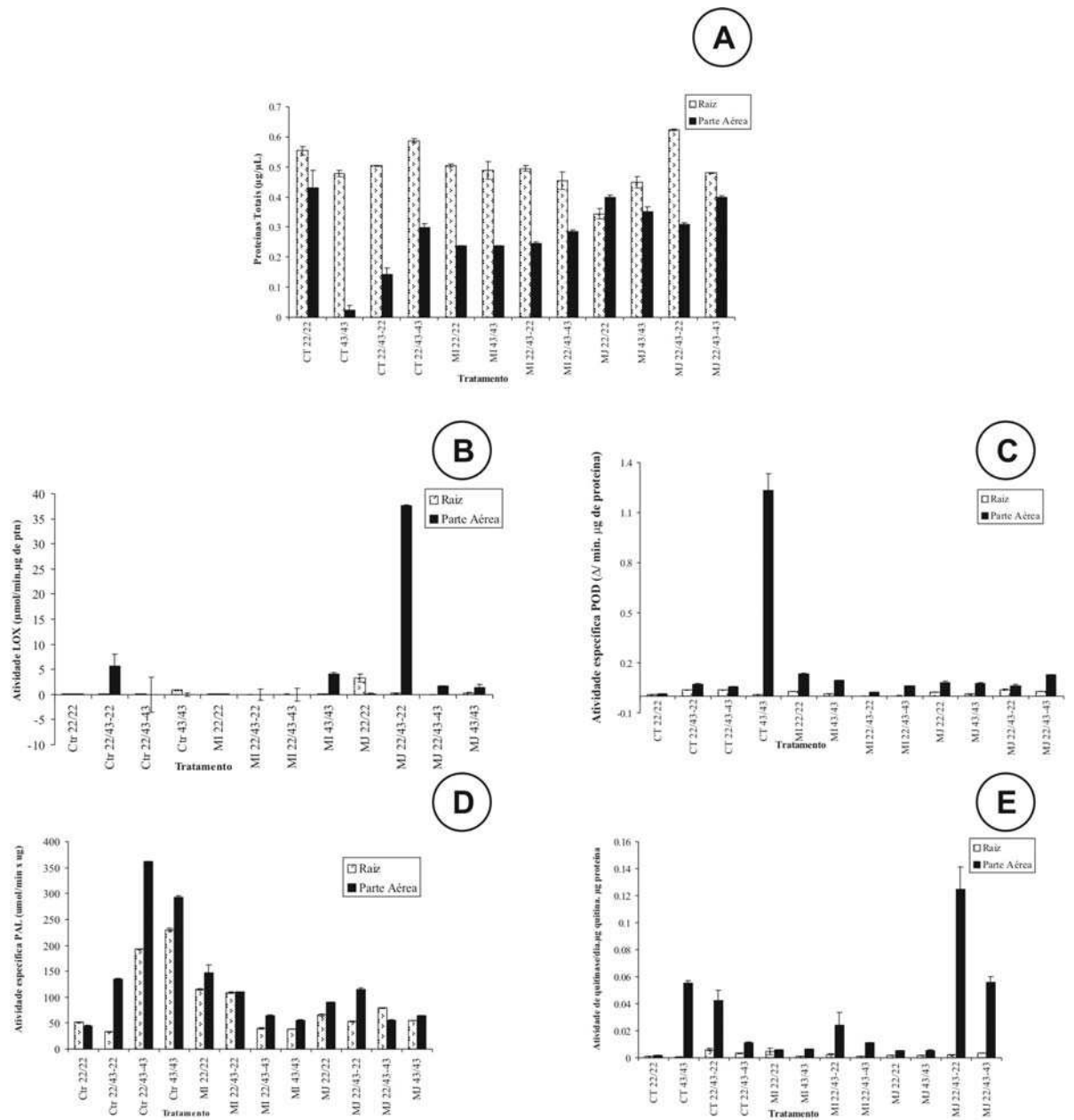
Em relação à Lipoxigenase (LOX), praticamente não houve expressão desta enzima nas plantas estudadas, porém ocorreu em maior concentração na parte aérea do tratamento MJ22/43-22 (Fig. 2B).

Ao analisarmos a expressão de Peroxidase (POD), comparativamente à LOX ocorreu em maior concentração, com maior expressividade na parte aérea. A combinação CT43/43 apresentou maior atividade (Fig. 2C).

A atividade de Fenilalanina Amônia-liase (PAL) foi detectada com maior expressão no controle do AC 43, principalmente na parte aérea, apresentando decréscimo na presença dos nematoides (MI) e (MJ). O mesmo ocorreu em relação ao AC 22, porém em menor quantidade quando comparado ao AC 43 (Fig. 2D).

Quanto à expressão da enzima Quitinase, esta ocorreu com maior expressão na parte aérea, tendo maior aumento da atividade na presença do nematoide *M. javanica* (Fig. 2E).

Tanto no acesso 22 quanto no acesso 43, em todos os tratamentos e combinações efetuados, não houve atividade expressa de  $\beta$ -1,3-Glucanase, tanto na parte aérea quanto no sistema radicular.



**Figura 2** – Atividade das proteínas totais e enzimas indicadoras do estado de indução a resistência de plantas encontradas nas raízes e parte aérea de *P. glomerata* [acesso 2202-15 (AC 22) e 2209-09 (AC 43)], de acordo com a combinação dos acessos vaso<sup>-1</sup> e o tratamento (ovos vaso<sup>-1</sup> do nematoide *M. incognita* ou *M. javanica* inoculado, ou controle – ausência). Barras indicam erro padrão da média. **A**: Proteínas Totais; **B**: Lipoxigenase (LOX); **C**: Peroxidase (PO); **D**: Fenilalanina Amônia-liase (PAL); **E**: Quitinase.

#### 4. DISCUSSÃO

A ocorrência de nematoides em *P. glomerata* já foi relatada por outros autores (Araújo et al., 1994; Alves et al., 2006; Gomes, 2006; Carneiro et al., 2007). Diferentes níveis de resistência e suscetibilidade ao nematoide de galhas (*M. incognita* raça 1) foram observados em acessos de *P. glomerata* (Gomes, 2006). No entanto, Iarema (2008) observou maior suscetibilidade ao ataque de insetos na parte aérea do acesso 2202-15 (AC 22). Este fato corroborou com o observado nesse trabalho, visto que o maior teor de 20E no sistema radicular foi observado no acesso 2202-15 (AC 22), e que apresentou menor concentração de 20E na parte aérea, ocorrendo o inverso para o acesso 2209-09 (AC 43).

A maior concentração de  $\beta$ -ecdisona presente neste acesso (Kamada, 2006) pode estar associada a essa interação inseto-planta. A hipótese mais aceita é que 20E atue como um fitoquímico protetor contra insetos fitófagos não adaptados (Festucci-Buselli et al., 2008), porém não atue como protetor ao ataque de nematoides. Nematoides expostos a 20E apresentaram os seguintes sintomas: imobilidade, redução da invasão, anormalidade no desenvolvimento e morte (Soriano et al., 2004), todavia não observados no presente experimento. É possível que os fitoecdisteroides possam proteger as plantas do ataque de artrópodes (Schmelz et al., 2002), o que merece atenção em estudos futuros.

Carneiro et al. (2007), avaliando os danos causados por *M. javanica* em *P. glomerata*, verificaram a ocorrência de galhas nas plantas parasitadas e que a média da massa fresca das raízes foi menor em relação à média das plantas testemunhas. Não houve influência na altura da planta ou na redução de porte, como também, nenhum outro sintoma de meloidoginose foi observado na parte aérea, ocorrendo o mesmo neste trabalho. Entretanto, esses autores sugerem que os danos dos nematoides ao longo do tempo podem ser ainda maiores do que os observados.

Aos 90 dias de avaliação, o acesso 43 não produziu galhas no tratamento de sistema radicular bipartido (Capítulo 1), porém quando submetido aos tratamentos com combinação de plantas em um mesmo vaso, passou a ser mais suscetível tanto ao ataque de nematoides quanto à formação de galhas em seu sistema radicular. É provável que isso deva à competição existente entre plantas, mesmo entre um mesmo acesso. Pois, a alelopatia e competição ocorrem simultaneamente, tornando-se difícil separar esses mecanismos de interferência em nível de campo (Inderjit & Del Moral, 1997). Além

disso, a competição entre mesmas espécies pode ser notavelmente diferente que competição entre plantas de populações distintas, sendo que a identidade da planta vizinha pode alterar os hábitos de crescimento, metabolismo e expressão de gene da planta (Broz et al., 2010).

A alelopatia é definida como qualquer efeito direto ou indireto, benéfico ou prejudicial, de uma planta sobre outra (Goldfarb et al., 2009). Porém, esse termo é controverso, podendo ser ampliado para outras interações bioquímicas (Halbrendt, 1996). Uma planta com potencial alelopático é dita de planta “doadora”, enquanto a planta próxima, afetada pelos compostos alelopáticos da planta doadora, é referida como “planta receptora”. As plantas receptoras e doadoras podem afetar umas às outras por alelopatia e competição. O efeito combinado destas duas interações tem como termo “interferência” (Muller, 1969).

Nas interações alelopáticas, algumas substâncias fitotóxicas são liberadas pelas plantas doadoras no ambiente, o que afeta o crescimento das plantas receptoras, enquanto que nas interações de competição um recurso de crescimento é afastado do ambiente por uma planta, de forma que os recursos de crescimento em interações competitivas disponíveis para outras plantas ficam reduzidos (Wu et al., 2000). Ou seja, a alelopatia distingue-se de competição, pois essa envolve a redução ou retirada de algum fator do ambiente necessário à outra planta no mesmo ecossistema, tal como a água, luz e nutrientes (Rezende et al., 2003).

Diferentes acessos dentro de espécies diferem significativamente na suscetibilidade para uma fonte alelopática (An et al., 1997). No processo ecológico da regeneração ou sucessão de espécies vegetais, a liberação de toxinas no meio promove vantagens na competição intraespecífica e interespecífica, além de interferir nas atividades de outros organismos e microrganismos (Brass, 2009).

No presente trabalho, aos 90 dias de observação, em *P. glomerata*, não ocorreram na parte aérea das plantas sintomatologias referente ao nematoide das galhas, que são similares as causadas por outros patógenos que reduzem a quantidade de água e nutrientes disponíveis para a planta. Além disto, as plantas infectadas geralmente apresentam crescimento reduzido e folhas pequenas e amareladas, que murcham prematuramente (Taylor e Sasser, 1983) visto que as espécies *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* (Chitwood) são as espécies mais nocivas da agricultura brasileira (Peixoto et al., 1999).

Muitos pesquisadores questionam que a alelopatia seja um fator significativo na interação planta-planta, pois as evidências sobre tal fenômeno são de difícil obtenção. É fácil demonstrar que os extratos ou os compostos purificados de uma planta possam inibir o crescimento de outra planta em experimentos de laboratório, mas não tem sido fácil demonstrar que esses compostos estejam presentes no solo, e em quantidades suficientes para alterar o desenvolvimento de um vegetal (Goldfarb et al., 2009).

Nematoides tem interações complexas com suas plantas hospedeiras, o que resulta em mudanças morfológicas e de desenvolvimento em ambos os organismos (Williamson e Hussey, 1996). Células estimuladas por nematoides tornam-se gigantes e exibem aumento da atividade enzimática, comparado às células adjacentes não estimuladas (Gommers e Dropkin, 1977).

A análise estrutural, verificada principalmente com o corante azul de toluidina, para ambos os acessos e nematoides utilizados, demonstrou que o córtex radicular apresentou-se com células do parênquima hipertrofiadas e hiperplásticas, sem a presença de células gigantes, enquanto o cilindro vascular encontrou-se desorganizado e com presença de células gigantes. Essas observações corroboram com o relatado no capítulo 1 e com outros pesquisadores (Gomes, 2006; Das et al., 2008; Westerich, 2009).

As reações positivas dos corantes histoquímicos utilizados corroboram com o observado por Curtis (2007), o qual verificou que a superfície da cutícula do nematoide é uma estrutura dinâmica e exerce funções fisiológicas importantes a qual contêm proteínas, carboidrato e lipídios.

Os nematoides das galhas secretam proteínas que capacitam o parasito a regular, direta ou indiretamente, genes hospedeiros específicos para a formação das células gigantes (Hussey, 2010). As células gigantes contêm mais proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos do que células normais (Bird, 1961). Dessa forma, os testes histoquímicos sugerem maior atividade proteica nas regiões de localização dos nematoides, sendo confirmado pela análise de proteínas totais, o qual foi possível constatar, para este experimento, maior expressão de proteínas totais no sistema radicular.

Compostos fenólicos, circundando a formação das células gigantes, indicam a resposta da planta à inoculação do nematoide, pois para se adaptarem às diferentes adversidades do ambiente, as plantas possuem mecanismos de defesa inativos ou latentes, que são ativados quando expostas a um agente eliciador (Antunes, 2008). Esse

agente eliciador pode ser biótico como o nematoide ou abiótico como temperatura ou estresse mecânico. Além disso, os compostos fenólicos apresentam diversas funções nos vegetais, sendo que a classe mais abundante é a derivada da fenilalanina. A PAL, enzima-chave na rota dos fenilpropanoides, está relacionada com resistência de plantas a patógenos (Wuyts et al., 2006; Arfaoui et al., 2007).

Entretanto, apesar de Arfaoui et al. (2007) e Jaiti et al. (2007) relatarem o aumento da atividade de fenilalanina amônia liase (PAL) na resistência de plantas à nematoides, foi observado que a maior expressão dessa enzima ocorreu na parte aérea das plantas de fáfia utilizadas, havendo redução da atividade frente à infestação dos nematoides, no presente trabalho. Tal redução ocorreu devido a desativação da via de síntese constitutiva de compostos fenólicos, similarmente ao observado no capítulo 1.

As lipoxigenases (LOX) vegetais utilizam o ácido linolênico (C18:3) ou ácido linoleico (C18:2) como substrato e estão associadas a importantes processos fisiológicos, tais como: biossíntese de compostos regulatórios, crescimento e desenvolvimento, senescência, germinação de sementes, resposta a ferimento, proteína de reserva vegetativa e resistência a insetos e patógenos. Quando os tecidos da planta são danificados por patógenos ou mecanicamente, ocorre uma degradação sequencial de lipídios, cujos produtos iniciais são os hidroperóxidos resultantes da ação das lipoxigenases (Silva et al., 2001). No presente trabalho, testes histoquímicos detectaram lipídios somente no corpo do nematoide (Sudan), porém apesar do nematoide afetar o sistema radicular, constatou-se também expressão das LOX na parte aérea de alguns tratamentos, com destaque para MJ 22/43-22.

A presença de nematoides desativou as vias de controle oxidativo das plantas de fáfia aqui estudadas, o que pode ser observado ao analisar as atividades das enzimas indicadoras do estado de indução da resistência, principalmente por apresentarem maior atividade na parte aérea.

As peroxidases (PO) estão envolvidas como importante componente de resposta a estresses em plantas, e parecem correlacionar-se com aumento quando infectadas por nematoides (Ibrahim, 1991), mas também podem atuar regulando os níveis de peróxido de hidrogênio nos tecidos das plantas, com o envolvimento da produção de superperóxido e peróxido de hidrogênio (Malolepza & Urbanek, 2000).

As quitinases e as  $\beta$ -1-3-glucanases constituem um grupo de enzimas hidrolíticas, distribuídas em plantas adultas, que são drasticamente induzidas quando as plantas respondem a processos de infecção por fungos, bactérias ou vírus patogênicos,

catalisando reações de quitina (Antunes, 2008). Porém,  $\beta$ -1-3-glucanases e quitinases, foram mais expressadas nos tratamentos controle (sem a presença do inoculado) em ambos os acessos. Isto indica desativação parcial da via de síntese de quitinases.

De forma geral, a maior expressão das atividades das enzimas indicadoras do estado de indução a resistência de plantas foram encontradas na parte aérea em todos os tratamentos utilizados. Tal fato foi observado no capítulo 1, o que pode estar correlacionado a desativação parcial das vias constitutivas de síntese de compostos fenólicos, controle oxidativo e quitinases decorrentes da presença dos nematoides.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R.B.N. **Caracterização morfológica, química e conservação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen**. Tese Doutorado - Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp. 129p., 2008.

ALVES, R.B.N.; MENDES, R.A.; MENDES, M.A.; CARNEIRO, R.M.D.G.; SILVA, D.B.; CARDOSO, L.D.; SALOMÃO, A.N.; VIEIRA, R.F. Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] germplasm conservation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8:1-4, 2006.

AN, M.; PRATLEY, J.E.; T. HAIG, T.; JELLETT, P. Genotypic variation of plant species to the allelopathic effects of vulpia residues. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 37: 647-660, 1997.

ANTUNES, P.W.P. **Proteômica e peptidômica aplicadas ao estudo da defesa de plantas de tomate à injúria mecânica**. (Dissertação em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, MG. 119p, 2008.

ARAÚJO, W. P; MATTOS, J.K.A.; SOUZA, R.M. Fontes de resistência a *Meloidogyne javanica* entre procedências de *Pfaffia glomerata*. **Fitopatologia Brasileira**, 19:322-323, 1994.

ARFAOUI, A.; EL HADRAMI, A.; MABROUK, Y.; SIFI, B.; BOUDABOUS, A.; EL HADRAMI, I.; DAAYF, F.; CHÉRIF, M. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45:470-479, 2007.

AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M.; LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybean. **Methods in Enzymology**, 71:441-451, 1981.

BIRD, A. The ultrastructure and histochemistry of a nematode-induced giant cell. **The Journal of Biophysical and Biocitochemical Cytology**, 11:701-715, 1961.

BONETI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, 6:553, 1981.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248-254, 1976.

BRASS, F.E.B. Análise de atividade alelopática de extrato aquoso de falsa-murta sobre a germinação de picão-preto e caruru. Centro Científico Conhecer - **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Goiânia, 5: 8, 2009.

BROZ, A.K.; BROECKLING, C. D.; DE-LA-PEÑA, C.; LEWIS, M. R.; GREENE, E. G.; CALLAWAY, R. M.; SUMNER, L. W.; VIVANCO, J. M. Plant neighbor identity influences plant biochemistry and physiology related to defense. **BMC Plant Biology**, 10:115, 2010.

CARNEIRO, R.M.D.G.; MESQUITA, L.F.G.; CIROTTO, P.A.S.; PEREIRA, S.I.V.; PEREIRA, P.S.; SILVA, D.B.; VIEIRA, R.F. Detecção de *Meloidogyne* spp. em *Pfaffia* spp. no Distrito Federal e patogenicidade de *M. javanica* a *Pfaffia glomerata* e *P. paniculata*. **Nematologia Brasileira**, 30:159-163, 2007.

CORRÊA JR., C. **Estudo agrônômico de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]: sazonalidade na produção de raízes e teors de  $\beta$ -ecdisona em diferentes acessos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul**. Tese de doutorado (Horticultura). UNESP/Botucatu, 96p., 2003.

CORTEZ, D.A.G.; TRUITI, M.C.T.; CORTEZ, L.E.R. Ginseng brasileiro: revisão bibliográfica. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, 2:299-306, 1998.

COUTINHO, I.D.; CARDOSO, C.A.L.; VIEIRA, M.C; RAMOS, M.B.M. Análise da presença de  $\beta$ -ecdisona e do perfil cromatográfico das raízes, flores e galhos de *Pfaffia glomerata* cultivada com 18 meses. **Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC - Fortaleza, CE - Julho/2005**.

CURTIS, R. H. C. Plant parasitic nematode proteins and the host-parasite interaction. **Briefings in functional genomics and proteomics**, 6(1): 50 -58, 2007.

DAS, S.; DEMASON, D. A.; EHLERS, J. D.; CLOSE, T. J.; ROBERTS, P. A. Histological characterization of root-knot nematode resistance in cowpea and its relation to reactive oxygen species modulation. **Journal of Experimental Botany**, 59(6): 1305–1313, 2008.

DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, 57:325-339, 2001.

DINAN, L.; HARMATHA, J.; VOLODIN, V.; LAFONT, R. Phytoecdysteroids: Diversity, Biosynthesis and Distribution. In: Guy Smagghe (Editor) **Ecdysone: Structures and Functions**, ISBN 978-1-4020-9111-7, Springer, Chapter 1; 43 p., 2009.

FERREIRA, A. G., BORGHETTI, F. [Organizadores]. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 323 p., 2004.

FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; OTONI, W.C. Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone – a review. **Botany**, 86: 978-987, 2008.

FIGUEIREDO, L.S.; TEIXEIRA, S.L.; FREITAS, S.P.; VIEIRA, I.J.C.; MARTINS, E.R. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) nas condições de Campos dos Goytacazes – RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 7:67-72, 2004.

GERLACH, D. **Botanische Mikrotechnik**. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 311p., 1984.

GOLDFARB, M.; PIMENTEL, L. W.; PIMENTEL, N. W. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. **Tecnologia. & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, 3(1): 23-28, 2009.

GOMES, A.C.M.M. **Resistência e caracterização histológica de acessos de *Pfaffia glomerata* a *Meloidogyne incognita***. (Dissertação de mestrado em Ciências Agrárias) Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 73 p., 2006.

GOMMERS, F.J.; DROPKIN, V.H. Quantitative histochemistry of nematode-induced transfer cells. **Phytopathology**, 67: 869-873, 1977.

HALBRENDT, J.M. Allelopathy in the management of plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, 28(1):8-14, 1996.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, 20:73-80, 1982.

HUSSEY, R. S. Go Where the Science Leads You. **Annual Review Of Phytopathology**, 48:1-19, 2010.

IAREMA, L. **Enxertia e propagação *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. (Tese de Doutorado Botânica) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 191p., 2008.

IBRAHIM, S. K. Peroxidase isoenzymes from *Meloidogyne* spp. cultured on different hosts. **Revue Nématol.** 14(3):335-344, 1991.

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

JAITI, F. MEDDICH, A.; EL HADRAMI, I. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against bayoud disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 71:166-173, 2007.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. Mc Graw-Hill Book Co. Inc., New York. 523p., 1940.

KAGIKI, F.O.; GONÇALVES, G.C.; OLIVEIRA, E.T.; CROCOMO, O.J.; GALLO, L.A. Indução de calos e produção de saponinas totais em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 7(1):43-50, 2004.

KAMADA, T. **Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] por RAPD, caracteres morfológicos e teor de  $\beta$ -**

**ecdisona**. (Tese de Doutorado Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 106p., 2006.

LEVER, M. A New reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, 47:273-279, 1972.

MAŁOLEPSZA, U.; URBANEK, H. The oxidants and antioxidant enzymes in tomato leaves treated with o-hydroxyethylrutin and infected with *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, 106: 657–665, 2000.

MAGALHÃES, P.M. Agrotecnología para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTÍNEZ, J.V.; BERNAL, H.Y.; CÁCERES, A. **Fundamentos de Agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Colombia: Convenio Andres Bello e CYTED (Serie Ciencia Y Tecnología, N° 83). p. 323-332, 2000.

MAIA, V. **Técnicas histológicas**. Atheneu, São Paulo. 1979.

MONTANARI JUNIOR, I. **Avaliação de genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen visando seu cultivo comercial**. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical/Melhoramento Genético Vegetal). Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 63 p., 2005.

MONTANARI, I.JR.; PERECIN, M.B. Evaluation of morphological and agricultural characteristics and their phenotypic correlations in genotypes of a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen population. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, 8:46-48, 2006.

MULLER, C. H. Allelopathy as a factor in ecological process. **Vegetatio**, 18:348-357, 1969.

NAKAI, S.; TAKAGI, N.; MIICHI, H.; HAYASHI, S.; NISHIMOTO, N.; TAKEMOTO, T.; KIZU, H. Pfaffosides, nortriterpenoid saponins, from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, 23(8):1703-1705, 1984.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; MARTINS, C.F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, 3(2):11-18, 2001.

NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.; ODASHIMA, S.; KIZU, H.; WADA, Y. Pfaffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, 23(1):139-142, 1984.

NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; FUJINO, M.; TAKEMOTO, T.; YEOH, C.L.; OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. Three ecdysteroid glycosides from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochemistry**, 27(6):1665-1668, 1988

O'BRIEN, T.P.; McCULLY, M.E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne – Australia: Termarcarphi Pty Ltd., 45 p., 1981.

PASCHOLATI, S.F.; NICHOLSON, R.L.; BUTLER, L.G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. **Journal of Phytopathology**, 115:165-172, 1986.

PEIXOTO, J. R.; MALUF, W. R.; CAMPOS, V. P. Evaluation of resistance of lines, hybrids F-1 and cultivars of sweet pepper to *Meloidogyne* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 34: 2259-2265, 1999.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 14<sup>a</sup> Edição, 477 p., 2000.

REZENDE, C de P.; PINTO, J.C.; EVANGELISTA, A.R.; SANTOS, I.P.A. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens plantas forrageiras. Lavras: UFLA, **Boletim Agropecuário**. p.18. 2003.

SCHMELZ E.A., GREBENOK R.J., OHNMEISS T.E., BOWERS W.S. Interactions between *Spinacia oleracea* and *Bradysia impatiens*: a role for phytoecdysteroids. **Arch. Insect Biochem. Physiol**, 51:204-221, 2002.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; NISHIGUCHI, Y.; KATO, K.; TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K; HASHIMOTO, G. Pfaffane-type nortriterpenoids from *Pfaffia pulverulenta*. **Phytochemistry**, 31(5):1737-1740, 1992.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; KATO, K.; NISHIGUCHI, Y.; TAKEMOTO, T.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K; HASHIMOTO, G. Pfaffane-type nortriterpenoids from *Pfaffia pulverulenta*. **Phytochemistry**, 33(4):897-899, 1993.

SILVA, M.D.; OLIVEIRA, M.G.A.; LANNA, C.; PIRES, C.V.; PIOVESAN, N.D.; JOSÉ, I.C.; BATISTA, R.B.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a *Diaphorte phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, agente causal do cancro-da-haste. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 13: 316-328, 2001.

SORIANO, I.R.; RILEY, I.T.; POTTER, M.J.; BOWERS, W.S. Phytoecdysteroids: a novel defense against plant-parasitic nematodes. **Journal of Chemical Ecology**, 30:1885-1898, 2004.

STAT SOFT. INC. **STATISTICA (data analysis software system)**. Version 7. www.statsoft.com., 2004.

TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; ODASHIMA, S.; WADA, Y. Pfaffic acid, a novel nortriterpene from *Pfaffia paniculata* Kuntze. **Tetrahedron Letters**, 24:1057-1060, 1983.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biología, identificación y control de los nematodos del nódulo de la raíz (Especies de *Meloidogyne*)**. Universidad del Estado de Carolina del Norte, 1983. 111 p.

THOMPSON, S.E.; SMITH, M.; WILKINSON, M.C.; PEEK, K. Identification and characterization of a chitinase antigen from *Pseudomonas aeruginosa* Strain 385. **Applied and Environmental Microbiology**, 67:4001-4008, 2001.

WILLIAMSON, V.M.; HUSSEY, R.S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **The Plant Cell**, 8:1735-1745, 1996.

WESTERICH, J. N. **Estudo do ciclo biológico de *Meloidogyne mayaguensis* e das alterações histopatológicas causadas por essa espécie em raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicon* L.)**. (Dissertação em Agronomia – Proteção de Plantas), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP. 85p, 2009.

WU H, PRATLEY J, LEMERLE D AND HAIG T. Laboratory screening for allelopathic potential of wheat (*Triticum aestivum*) accessions against annual ryegrass (*Lolium rigidum*). **Australian Journal of Agriculture**, 51: 259-266, 2000.

WUYTS, N.; MAUNG, Z.T.Z.; SWENNEN, R.; WAELE, D. Banana rhizodeposition: characterization of root border cell production and effects on chemotaxis and motility of the parasitic nematode *Radopholus similis*. **Plant and Soil**, 283:217–228, 2006.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ O sistema radicular bipartido demonstrou que há comunicação sistêmica entre as raízes de fáfia aqui estudadas;
- ✓ A inoculação de ovos de nematoides promoveu maior acúmulo de  $\beta$ -ecdisona em menor tempo;
- ✓ O AC 22 acumulou mais  $\beta$ -ecdisona nas raízes enquanto que o AC 43 acumulou maior teor de  $\beta$ -ecdisona na parte aérea;
- ✓ Ambos os acessos estudados são tolerantes à presença do nematoide;
- ✓ A combinação dos acessos no mesmo vaso promoveu a interferência, como a competição à qual gerou menor tolerância dos acessos aos nematoides *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*;
- ✓ De forma geral, a presença do nematoide promoveu desativação parcial das vias de síntese constitutiva de compostos fenólicos, controle oxidativo e de quitinases, para as plantas aqui mencionadas.