

Detecção de *Meloidogyne* spp. em *Pfaffia* spp. no Distrito Federal e Patogenicidade de *M. javanica* a *Pfaffia glomerata* e *P. paniculata*

REGINA M.D.G. CARNEIRO¹, LUIZ.F.G. MESQUITA¹, PEDRO A. S. CIROTTTO¹, SARAZETE IZIDIA VAZ PEREIRA², PAULO S. PEREIRA², DIJALMA B. SILVA¹ & ROBERTO F. VIEIRA¹

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 02372, 70849-970 Brasília, DF.

² Unidade de Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, 14096-900, Ribeirão Preto, SP, Brasil
recar@cenargen.embrapa.br

Recebido para publicação em 18/03/2006. Aceito em 30/10/2006

Resumo – Carneiro, R.M.D.G.; L.F.G. Mesquita; P.A.S. Cirotto; S.I.V. Pereira; P.S. Pereira; D.B. Silva & R.F. Vieira. 2006.. Detecção de *Meloidogyne* spp. em *Pfaffia* spp. no Distrito Federal e patogenicidade de *M. javanica* a *P. glomerata* e *P. paniculata*

Conhecidas como “Ginseng Brasileiro”, *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia paniculata* são plantas medicinais que possuem propriedades tônicas e anti-cancerígenas, respectivamente. Detectou-se no Distrito Federal, *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* e *Meloidogyne* sp., causando sérios danos ao sistema radicular dessas plantas, onde estão armazenados os princípios ativos medicinais. Essas espécies de *Meloidogyne* ocorreram em populações mistas, em condições de campo, com a predominância de *M. javanica*. A identificação das espécies foi feita através da caracterização isoenzimática (esterases) e configuração da região perineal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade de *M. javanica* a *P. glomerata* e *P. paniculata*. Plantas de dois meses de idade (6 repetições/ espécie) receberam aproximadamente 30.000 ovos/planta de *M. javanica*. As plantas não inoculadas serviram como testemunhas para cada espécie de fâfia. Após um período de 8 meses em telado, as raízes foram coletadas, avaliadas a massa, a sintomatologia e a reprodução do nematóide. *P. glomerata* e *P. paniculata* apresentaram alta suscetibilidade a *M. javanica*. As duas espécies apresentaram reações diferentes, pois em *P. glomerata* ocorreu grande número de galhas e em *P. paniculata* raízes engrossadas e necrosadas. Diferenças importantes foram observadas na massa fresca das raízes. Em *P. glomerata* infectada, a massa das raízes foi inferior ao da testemunha e, em *P. paniculata*, foi superior ao da planta sadia. Quanto à concentração do princípio ativo (â - ecdisterona) nas raízes, pode-se observar um significativo aumento nas plantas parasitadas pelo nematóide, sobretudo em *P. glomerata*.

Palavras chave: Nematóide das galhas, *Pfaffia* spp, fenótipo de esterase, danos, sintomas, raízes, â - ecdisterona

Summary – Carneiro, R.M.D.G.; L.F.G. Mesquita; P.A.S. Cirotto; S.I.V. Pereira; P.S. Pereira; D.B. Silva & R.F. Vieira. 2006. Detection of *Meloidogyne* spp. on *Pfaffia* spp in the Federal District, Brazil and pathogenicity of *M. javanica* on *Pfaffia glomerata* and *P. paniculata*

Pfaffia glomerata and *P. paniculata*, better known as “Brazilian Ginseng”, are medicinal plants with tonic and anti-cancer properties, respectively. *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* and *Meloidogyne* sp. were detected in the Federal District of Brazil, causing serious damage to the roots of these plants, where the active medicinal ingredients are stored. *Meloidogyne* spp. sometimes occurred in mixed populations in field conditions, with predominance of *M. javanica*. The identification of *Meloidogyne* species was made using isozyme characterization (esterases) and perineal patterns. The objective of this paper was to evaluate the pathogenic ability of *M. javanica* in *P. glomerata* and *P. paniculata*. Two-month old plants of each species (replicated 6 times) received approximately 30,000 eggs of *M. javanica* per plant. No inoculated plants were used as control. After a period of 8 months, in greenhouse conditions, the roots were collected, weighed and evaluated for nematode symptoms

and reproduction. *P. glomerata* and *P. paniculata* showed high susceptibility to *M. javanica*. The two species presented different reactions to the nematode attack: while *P. glomerata* showed a great number of galls, *P. paniculata* presented necrosed and enlarged roots. Important differences were observed in fresh weight of roots. For *P. glomerata* the weight was lower in infected roots when compared with the control. For *P. paniculata*, healthy roots presented lower weight. Considering the concentration of β -ecdisterone in roots, a significant increase was observed in the plants infected by the nematode, especially for *P. glomerata*.

Keywords: root-knot nematodes, *Pfaffia* spp., esterase phenotype, damage, symptoms, roots, β -ecdisterone.

Introdução

As espécies *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Pfaffia paniculata* Kuntze, conhecidas como “Ginseng Brasileiro”, são plantas medicinais nativas pertencentes à família *Amaranthaceae*. Suas raízes possuem amplo uso popular, sendo empregadas como tônicas, estimulantes, afrodisíacas, anti-diarréicas e ainda possuem propriedades terapêuticas no tratamento de diabetes e hemorróidas (Shiobara, 1993 e Nishimoto, 1992). Considerando a grande demanda do mercado externo e interno, e a forma de exploração por extrativismo, essas espécies são de alta prioridade para conservação de recursos genéticos (Vieira *et al.* 2002).

Pfaffia glomerata é planta perene de hábito arbustivo e contém diversos hormônios, dos quais se destaca a β -ecdisona predominante em suas raízes. *Pfaffia paniculata* possui hábito trepador, tendo como principal constituinte o ácido pfaffico, e suas raízes possuem propriedades anticancerígenas (Takemoto & Odajima, 1984).

Entre os países que importam essas plantas se destaca o Japão, onde espécies do gênero foram amplamente estudadas tanto do ponto de vista fitoquímico quanto farmacológico. O Brasil é o maior produtor e exportador de *Pfaffia*, entretanto, existem vários fatores fitossanitários limitantes que podem prejudicar o cultivo do “ginseng brasileiro”. Entre os patógenos, se destacam os nematóides do gênero *Meloidogyne*, causando galhas e apodrecimento nas raízes (Araújo *et al.*, 1994), onde estão armazenados os princípios ativos medicinais. O objetivo deste trabalho foi identificar as espécies de nematóides de galhas que ocorrem em *Pfaffia* spp. no Distrito Federal e avaliar os danos causados por *Meloidogyne javanica* a duas espécies de ginseng: *P. glomerata* e *P. paniculata*.

Material e Métodos

Obtenção e propagação das plantas

Em 2001, clones de *Pfaffia glomerata* e de *P. paniculata*, procedentes da Unicamp – CPQBA e mantidas em vasos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Estacas da parte aérea de ambas espécies foram plantadas em bandejas com solo esterilizado. Após o pegamento, as mudas foram transplantadas para vasos de 14 litros de solo esterilizado, corrigido e adubado, totalizando 12 plantas para cada espécie (1 planta/vaso).

Identificação de espécies de *Meloidogyne* spp.

Plantas de *P. glomerata* e *P. paniculata* provenientes do Distrito Federal, apresentando sintomas de meloidoginose no sistema radicular, foram analisadas no laboratório de Nematologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As fêmeas dos nematóides individualizadas foram extraídas das galhas, processadas e identificadas através do perfil enzimático, de acordo com metodologia descrita por Carneiro & Almeida (2001). A seguir, a espécie *M. javanica* e *M. incognita* foram purificadas, de acordo com a mesma metodologia. Cortes da região perineal das populações purificadas foram realizados em fêmeas adultas de *Meloidogyne* spp., em 45% de ácido láctico e montados em glicerina (Taylor & Netscher, 1974).

Patogenicidade de *M. javanica* ao ginseng brasileiro

Seis plantas de cada espécie de *P. glomerata* e *P. paniculata*, com 2 meses de idade, receberam inóculo de aproximadamente 30.000 ovos/planta de *M. javanica*, em vaso de 16 litros mantidos em casa de vegetação, sendo que outras seis, serviram como testemunhas (não inoculadas). Após 8 meses da inoculação, a altura da parte

aérea das plantas e a massa fresca das raízes foram avaliadas. As raízes das plantas inoculadas com o nematóide foram coradas com floxina B, para visualização e contagem das massas de ovos e galhas e determinação do índice de Hartman & Sasser (1985). Posteriormente, os ovos foram extraídos de cada raiz infectada, pelo método de Hussey & Barker (1973), quantificados em lâminas de Peters, sendo realizado o cálculo do fator de reprodução (FR) do nematóide, que é o cociente entre a população final e inicial.

Dosagem de β -ecdisterona: extração e análises por CLAE

Vinte gramas de raízes frescas de cada planta (24) foram secas em estufa de ar circulante a 38°C. As raízes moídas (200 mg) de cada amostra foram submetidas a extração com 5 ml de metanol em ultrassom por 30 minutos. Quatro mililitros do extrato foram filtrados e o solvente evaporado à temperatura ambiente.

Os extratos obtidos foram ressuspensos em 1 ml de MeOH:H₂O (1:1), submetidos a partição com 1 mL de hexano, a fase hidroalcolica filtrada em filtro de náilon, 0,45 μ m (Alltech) e analisadas por CLAE. Cada amostra foi submetida à extração em triplicata.

Na análise por CLAE, foi utilizado cromatógrafo líquido Shimadzu com detector de arranjo de dióxido (modelo SPD-M10A *vp*) e injetor automático (modelo SIL-10AD *vp*). A coluna utilizada foi SupelcosilTM LC18 (4,6 x 250mm, Supelco). A fase móvel foi MeOH:H₂O (ácido acético, 0.1%), 10:90 a 30:70 gradiente linear por 15 min; 30:70 isocrático por 10 min; 30:70 a 100:0 gradiente linear por 25 min e 100:0 a 10:90 gradiente linear por 5 min, sendo o tempo total de análise de 60 min. O fluxo foi 1,0 ml/min e a detecção a 240 nm. O método utilizado para a análise foi a padronização externa, sendo selecionados 3 pontos para curva.

Resultados e Discussão

Identificação de espécies de *Meloidogyne* spp.

A análise dos perfis de esterase (Est) mostraram, nas quatro amostras analisadas de *P. glomerata* e *P. paniculata* uma mistura de *M. javanica* (Est J3, Rm: 1,0, 1,25, 1,4) e *M. incognita* (Est I1, Rm: 1,0, 1,1), predominando a primeira espécie. Em uma amostra de *P. glomerata*, proveniente do Distrito Federal, foi registrada a presença de um perfil de esterase atípico (Est G3, Rm: 1,1, 1,2, 1,3), sendo a banda do meio (Rm: 1,2), muito mais intensa que as outras duas (Fig. 1). Quanto à posição das bandas, esse perfil se assemelhou muito a *M. arenaria* (Carneiro *et al*, 2000). Mas em *M.*

arenaria, as três bandas apresentam a mesma intensidade. A região perineal dessa população apresentou uma configuração atípica, ora lembrando a *M. incognita* ora a *M. arenaria*. Mais estudos morfológicos são necessários para esclarecer a identidade taxonômica dessa população.

Patogenicidade de *M. javanica* a *P. glomerata* e *P. paniculata*

Os resultados estão apresentados na Tabela 1. Observou-se que não houve influência dos danos causados pelo nematóide na altura das plantas. A parte aérea de ambas as espécies não apresentou sintomas de meloidoginose, ou seja, redução de tamanho, queda das folhas e sintomas de deficiência de minerais, típicos de *Meloidogyne* spp. (Lordello, 1973). De maneira geral, pôde-se observar que a testemunha de *P. paniculata* apresentou massa média de raízes muito inferior ao das plantas parasitadas, não ocorrendo formação de galhas. O contrário ocorreu com *P. glomerata*, com as plantas parasitadas apresentando massas frescas médias de raiz, estatisticamente inferiores às plantas testemunhas. Esse sintoma de redução de sistema radicular é característico da meloidoginose e deve-se sobretudo ao mau desenvolvimento das raízes primárias e secundárias (Lordello, 1973).

De uma maneira geral, *P. glomerata* e *P. paniculata* responderam de forma diferenciada ao parasitismo do nematóide. *Pfaffia glomerata* apresentou maior índice de galhas (4,8) e sintomas característicos (Figuras 2C e 2D). No caso de *P. paniculata*, não ocorreu a formação de galhas e sim, engrossamentos de raízes, com lesões e necroses nos locais parasitados por *M. javanica* (Figura 2E e 2F). Os fatores de reprodução do nematóide foram em média de 10,0 em *P. paniculata* e 7,9 em *P. glomerata*, o que caracteriza serem os acessos estudados das duas espécies altamente susceptíveis ao nematóide. Entretanto, as duas espécies de *Pfaffia* não apresentaram redução de porte e nenhum outro sintoma de meloidoginose na parte aérea (Fig. 2A, B).

Quanto à concentração de β -ecdisterona pôde-se observar significativo aumento nas plantas parasitadas pelo nematóide, sobretudo em *P. glomerata*. O estímulo ao aumento do teor de β -ecdisterona pode estar relacionado a resposta química da planta ao ataque dos nematóides, pois é conhecido que metabólitos secundários possuem importante função ecológica na adaptação de plantas, atuando como protetores na herbivoria e infecção por patógenos (Taiz e Zeiger, 1998). Alguns esteróides são produtos do metabolismo secundário e estão associados à defesa da planta, como os fitoesteróides. Esse aumento foi

Tabela 1. Comportamento de duas espécies de *Pfaffia* quanto ao parasitismo de *Meloidogyne javanica*

Plantas	Altura das plantas (m)	Massa média das raízes frescas (g)	Índice de Galhas e de massas de ovos	Número total de ovos	Fator de reprodução	Concentração média de β ecdisterona mg/g de peso seco das raízes
<i>P. paniculata</i>						
Sadias	1,89 a *	92,72 a	0 e 0	0 e 0	0 e 0	9,48 a
Infestadas	1,81 a	414,50b	1,70 e 4,70	301.666	10,0	11,45 b
<i>P. glomerata</i>						
Sadias	1,86 a	718,71b	0	0	0	20,88 a
Infestadas	1,96 a	460,52a	4,80 e 4,30	239.540	7,96	38,25 b

*Médias (seis repetições/tratamento) seguidas de letras diferentes, duas a duas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

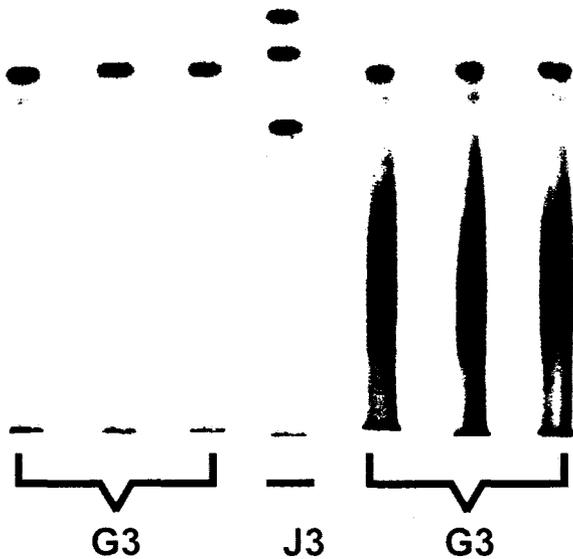


Figura 1. Fenótipo de esterase de *Meloidogyne* sp. (Est G3). *M. javanica* (Est J3) foi usada como referência.

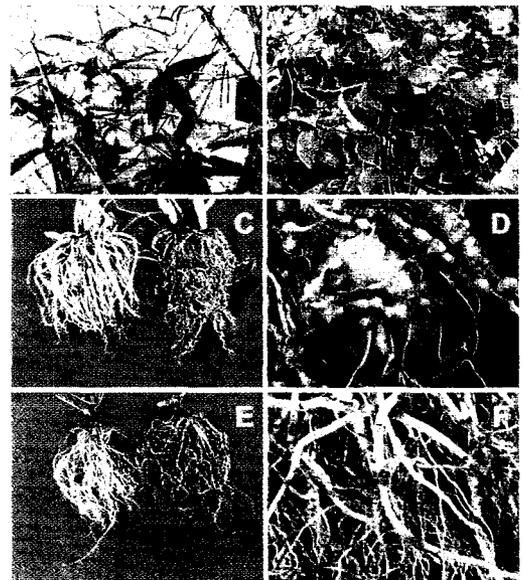


Figura 2. A - Parte aérea de plantas de *P. glomerata*. (A) e de *P. paniculata*.(B). Raiz sadia de *P. glomerata* à esquerda e raiz parasitada por *M. javanica* à direita (C). Galhas em *P. glomerata* (D). Planta sadia de *P. paniculata* à esquerda e raiz parasitada por *M. javanica* à direita (E). Necroses e engrossamentos em *P. paniculata* (F).

relativo, uma vez que o nematóide reduziu significativamente a massa fresca das raízes parasitadas em *P. glomerata* (Tabela 1). Considerando que as *Pfaffia* são plantas perenes, os danos causados pelos nematóides ao longo do tempo podem ser ainda maiores do que os observados neste trabalho, no qual as plantas foram avaliadas com 10 meses de idade. Mais estudos são necessários no sentido de quantificar os constituintes químicos de *Pfaffia* spp. e relacioná-los com os danos causados pelos nematóides no sistema radicular, durante um período de tempo maior.

Literatura Citada

- ALCÂNTARA, M.F.A. 1994 Atividade antimicrobiana de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. XIII Simpósio de plantas medicinais do Brasil. Fortaleza – CE. p. 72.
- ARAÚJO, W.P.; J.K.A. MATTOS & R.M. SOUZA. 1994. Fontes de resistência a *Meloidogyne javanica* entre procedências de *Pfaffia glomerata* Fitopatologia Brasileira 19 (Suplemento): 322-323.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & M.R.AALMEIDA. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. Nematologia Brasileira 25, 35-44.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, A.R.A. & P. QUÉNÉHÉRVÉ. 2000. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. isolates. Nematology 2, 645-654.
- HARTMAN, K.M. & J.N. SASSER. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Carter, C. C. & Sasser, J. N. eds. An advanced treatise on *Meloidogyne*, vol. I, Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics. 69–77.
- HUSSEY, R.S. & K.R. BARKER. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. Plant disease reporter, 57:1025-1028.
- LORDELLO, L.G.E. 1973. Nematóides da plantas cultivadas. Livraria Nobel, São Paulo, 197p.
- NISHIMOTO, N. 1992. The constituents of Brazilian Ginsengs. Anais do XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil – Univ. do Paraná. Curitiba, PR. p 167.
- SHIOBARA, Y. 1993. Pfaffane-type nortriterpenoids from *P. pulverulenta*. Phytochemistry., 31(3): 953 – 956.
- TAIZ, L. & E. ZEIGER. 2002. Plant physiology. 3 ed. Sunderland., 690 p.
- TAKEMOTO, T. & T. ODAJIMA. 1984. Antitumor pfaffosides from brazilian carrots. Japanese Kokai Tokkyo Koho JP, 59:184-198.
- TAYLOR, D.P. & C. NETSCHER. 1974. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. Nematologica 20, 268-269.
- VIEIRA, R.F.; S.R. SILVA; R.B. NEVES; D.B. SILVA; T.A.B. DIAS; M.C.F.V. UDRY; M. WETZEL & R.C. MARTINS. 2002. Estratégias para Conservação e Manejo de Recursos Genéticos de Plantas Mediciniais e Aromáticas: Resultados da I Reunião Técnica. Brasília, DF: Embrapa / Ibama / CNPq 184p.