

**Brasília, DF  
Novembro 2008**

**Autores**

Charles Dayler Silva de  
Almeida  
UnB

Djair dos Santos de Lima e  
Souza  
UnB

Rafael Perseghini del Sarto  
UnB

Alexandre Augusto Pereira  
Firmino  
UFRGS

Tiago Siqueira Silva  
Universidade Católica de  
Brasília

José Cesamildo Cruz  
Magalhães  
Embrapa Recursos  
Genéticos e Biotecnologia

Maria Fátima Grossi de Sá  
Embrapa Recursos  
Genéticos e Biotecnologia

Thales Lima Rocha  
Embrapa Recursos  
Genéticos e Biotecnologia



## **Fracionamento de extrato aquoso de sementes de *Crotalaria* *espectabilis* efetivo no controle de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita***

### **1. INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos, a agricultura vem ganhando destaque na economia mundial, respondendo, no ano de 2004, por 8,52% de todos os produtos que foram exportados no mundo. No Brasil as cifras são maiores, chegando a 33% do PIB nacional (OMC, 2008).

Previsões recentes estimam a produção brasileira de grãos do ano base 2007/2008 em 136 milhões de toneladas. Os principais produtos agrícolas são soja, milho, cana-de-açúcar, café, algodão e carne bovina (IBGE, 2008; OMC, 2008).

O cerrado é uma das áreas de produção de maior destaque no país. Essa importância foi adquirida com o uso de tecnologias geradas na década de 70, as quais até hoje vêm sendo melhoradas e difundidas. Os principais problemas superados na região dos cerrados foram a toxidez do solo com alumínio, a adaptação de culturas a altitudes e latitudes da região, a mecanização e os adubos e defensivos químicos (REZENDE, 2008; EMBRAPA, 1986). Essas melhorias levaram a um modelo de exploração agrícola intensivo. Esse sistema agrícola, denominado monocultivo, consiste no plantio em vastas áreas fazendo uso de poucas espécies vegetais. Isso fornece microclima e substrato para o desenvolvimento de pragas e doenças.

Visando a manutenção de grandes produtividades, e conseqüentemente dos grandes lucros, os produtores lançam mão de defensivos agrícolas como a principal forma de controle de doenças, plantas espontâneas e pragas. No entanto, em muitas situações, esse uso não obedece às recomendações técnicas, resultando em super dosagens, as quais podem levar a problemas de intoxicação humana, contaminação ambiental e resistências dos organismos a serem controlados (MEYER et al., 2007; COSTABEBER, 2006; GRISÓLIA, 2005).

Os principais organismos responsáveis pelo uso massivo de defensivos agrícolas são as doenças, plantas espontâneas e as pragas. As plantas espontâneas competem com as espécies cultivadas por luz, espaço, nutrientes, água, além de serem hospedeiros secundários de inúmeras doenças e pragas. O controle destas plantas se dá por meio de catação manual, sistemas consorciados e uso de

herbicidas (ALVES et al., 2007; FÁVERO et al., 2001; ROSÁRIO et al., 2008; FERREIRA NETO et al., 2008; MARTINI et al., 2002).

Com relação às pragas, as principais ordens de insetos com potencial de causar danos são: Afídeos (ordem Hemiptera - Aphidoidea), Percevejos (ordem Hemiptera - Heteroptera), besouros (ordem Coleoptera), lagartas, traças (Ordem Lepidoptera) e moscas: larvas minadoras (ordem Diptera). Causam prejuízos a todas as espécies de plantas cultivadas. Os principais métodos de controle são o Manejo integrado de pragas (MIP), a rotação de culturas, o uso de inseticidas e, mais recentemente, o uso de metabólitos secundários (GALLO et al., 2002; IMENES e IDE, 2002; SOSA e TONN, 2008).

Os principais agentes causadores de doenças em plantas são os vírus, as bactérias, os fungos e os nematóides. Tais agentes atacam as plantas em todas as suas fases de desenvolvimento, levando a grandes perdas, que em alguns casos podem alcançar 80% dos campos de produção. Como exemplos de culturas atacadas por doenças, temos os citrus, a soja, o feijão, o café e o algodão (BLUM, 2002; BERGAMIM FILHO et al., 1995; BERGAMIM FILHO et al., 2005; BALDANI et al., 1997).

Dentre os principais fitopatógenos, os nematóides merecem atenção especial. Eles são minúsculos vermes filiformes componentes do filo nematoda, e estão entre as criaturas mais abundantes do planeta (BERGAMIM FILHO et al., 1995). Os nematóides podem ser separados em dois grandes grupos, os de vida livre e os parasitos. São muito difíceis de serem controlados e causam prejuízos anuais da ordem de bilhões de dólares, atacando um vasto grupo de plantas cultivadas (BAKHETIA et al., 2008).

Os nematóides que atacam plantas são parasitos obrigatórios e pertencem a duas classes principais, os formadores de galha (*Meloidogyne* spp.) e os formadores de cisto (*Globodera* spp. e *Heterodera* spp.). O controle desses fitopatogenos é feito principalmente por meio de defensivos químicos, os quais acarretam uma série de danos ao meio ambiente. Porém, outras formas de controle vêm sendo estudadas com êxito. Podemos citar a rotação de culturas, o pousio, o uso de plantas antagonistas e o uso de metabólitos secundários (BERGAMIM FILHO et al., 1995; CHITWOOD, 2002; WILLIAMSON, 1998; WILLIAMSON e GLEASON, 2003).

As plantas são fonte de vários compostos químicos, que são desenvolvidos durante seu metabolismo. Esses compostos desempenham papéis variados, que vão desde a defesa até atração de polinizadores (VERPOORTE et al., 2000; YEA e NG, 2005; SOSA e TONN, 2008). Uma boa fonte de fitocompostos são as sementes, que são constituídas por carboidratos, proteínas, lipídios e outras substâncias de extrema importância alimentícia para humanos e animais. Por ser a responsável pela perpetuação da espécie, carregando toda a informação genética para a formação de outro ser, a semente também é constituída por outros compostos envolvidos na sua proteção contra pragas e doenças. Devido a todas essas características, também são utilizadas como alimento por pragas e agentes infecciosos que podem torná-las inférteis e impróprias ao consumo humano (FERNANDES et al., 1993). Alguns relatos científicos mencionam atividade nematostática e nematicida presente em muitos vegetais (FERRAZ e FREITAS, 2000). O gênero *Crotalaria* spp. é amplamente distribuído no continente americano e tem sido citado como

fonte de espécies vegetais ativas no controle de fitonematóides. Membros importantes deste grupo são *C. spectabilis* (Figura 2), *C. paulinea* e *C. juncea*. Tais membros apresentam atividade supressora de populações de nematóides quando usadas em consórcio, rotação de culturas e também como fonte de extratos (FERRAZ e FREITAS, 2000; AMARAL et al., 2002).

Seguindo a tendência de busca por moléculas vindas de fontes naturais, e que tenham atividade contra pragas e doenças de interesse agrônômico, pesquisas nessa área vêm sendo desenvolvidas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Neste trabalho, são apresentadas frações isoladas de *C. spectabilis* que apresentam moléculas com atividade contra J<sub>2</sub> de *M. incognita*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material biológico

#### Vegetal

O material de estudo foram sementes de *Crotalaria spectabilis*, planta pertencente à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae. As sementes foram obtidas junto à equipe responsável pela vitrine de tecnologias da Embrapa – Sede.

#### Animal

### Obtenção de Juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *M. incognita*

Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) foram infectadas aos 20 dias após a germinação com J<sub>2</sub> de *M. incognita* e mantidas em casa de vegetação até os três meses de idade, momento em que as raízes apresentaram número acentuado de galhas. Para a obtenção dos ovos, as raízes foram seccionadas e trituradas em um

liquidificador contendo solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, de acordo com a metodologia desenvolvida por Hussey e Barker, (1973). A suspensão contendo os ovos de *M. incognita* raça três foi submetida à técnica de funil de Baemann modificada, por um período de 48 horas, para a obtenção dos J<sub>2</sub>. Após este passo, os J<sub>2</sub> eclodidos foram centrifugados a 2000g durante cinco minutos, e posteriormente contados em lâmina de Peters no microscópio óptico.

### Obtenção do extrato aquoso

Dez gramas de sementes de *C. spectabilis* foram trituradas em moedor de café até a obtenção de um pó fino. O pó foi então colocado em suspensão contra H<sub>2</sub>O milliQ (1:6 p/v) e mantido sob agitação a 4°C durante 12 horas. O material homogeneizado foi filtrado em gaze e subsequentemente centrifugado a 12000 g durante 45 minutos. O pellet foi descartado e o sobrenadante com um volume de 60 mL foi filtrado em filtro Millipore de 0,45 µm. Após este procedimento, o sobrenadante filtrado foi dializado em membrana porosa de 3,5kDa contra 2L de H<sub>2</sub>O destilada durante 12 horas, a 4°C, em câmara fria. Duas frações foram obtidas após este procedimento, e denominadas dialisado externo (DE), fração menor que 3,5kDa, e dialisado interno (DI), fração maior que 3,5kDa. As frações de DE e DI foram congeladas, liofilizadas e estocadas a -80°C.

### Ensaio de atividade

Para a avaliação do efeito extrato cru (EC), dialisado interno (DI) e do dialisado externo (DE) sobre a mortalidade dos nematóides, foram utilizadas aliquotas de 500 µl e 1 mL de EC, DI e DE individualmente, contra 100 J<sub>2</sub> em volume

final de 3mL por poço da placa de petri. As placas foram mantidas no escuro a temperatura de 28°C durante 24 horas. Após esse período, foi processada a contagem de nematóides vivos e mortos, usando-se lâmina de Peters e microscópio óptico. Os dados referentes à constituição das soluções usadas no ensaio de mortalidade estão detalhados nas tabelas 1, 2 e 3. Os percentuais

de mortalidade estão representados pelos gráficos: 1, 2 e 3. Para a certificação da morte dos J<sub>2</sub>, estes foram transferidos para tubos de 1,5mL contendo H<sub>2</sub>O destilada por um período de duas horas. Transcorrido esse período, os J<sub>2</sub> foram transferidos para lâmina de Peters e visualizados em microscópio óptico.

**Tabela 1.** Bioensaio usando diferentes volumes do extrato cru sobre juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *M. incognita*.

Ensaio de atividade extrato cru				
	Qtde de extrato	Nº de nematóides	H <sub>2</sub> O	Total
Extrato cru	500µL	100 (260µL)	2240µL	3mL
Extrato cru	1000µL	100 (260µL)	1740µL	3mL
Controle negativo (H <sub>2</sub> O)	0µL	100 (260µL)	3000µL	3mL

**Tabela 2.** Bioensaio usando diferentes volumes das frações dialisadas contra juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *M. incognita*.

Ensaio de atividade com frações aquosas de diálise				
	Qtde de extrato	Nº de nematóides	H <sub>2</sub> O	Total
Fração (DE)	500µL	100 (260µL)	2240µL	3mL
Fração (DE)	1000µL	100 (260µL)	1740µL	3mL
Fração (DI)	500µL	100 (260µL)	2240µL	3mL
Fração (DI)	1000µL	100 (260µL)	1740µL	3mL
Controle negativo (H <sub>2</sub> O)	0µL	100 (260µL)	3000µL	3mL

### Teste *in vitro* para avaliação da atividade biológica do EC, DE e DI sobre J<sub>2</sub> de *M. incognita*

Detectada a atividade no DE, procedeu-se ao acúmulo desse material mediante novas extrações, que foram reunidas e armazenadas a -20°C. Alíquota do DE contendo 250µL de material foi carregada em uma coluna Vydac C-18 TP 512 semi-preparativa. A amostra foi fracionada sob fluxo de 2 mL por minuto, utilizando-se um

gradiente linear 0-100% (p/v) de acetonitrila – 0,1% ácido trifluoracético (TFA). Todos os picos foram coletados separadamente, liofilizados, pesados e posteriormente usados em novos bioensaios (tabela 3). Esse procedimento foi repetido várias vezes para acúmulo de material que será usado em novos ensaios.

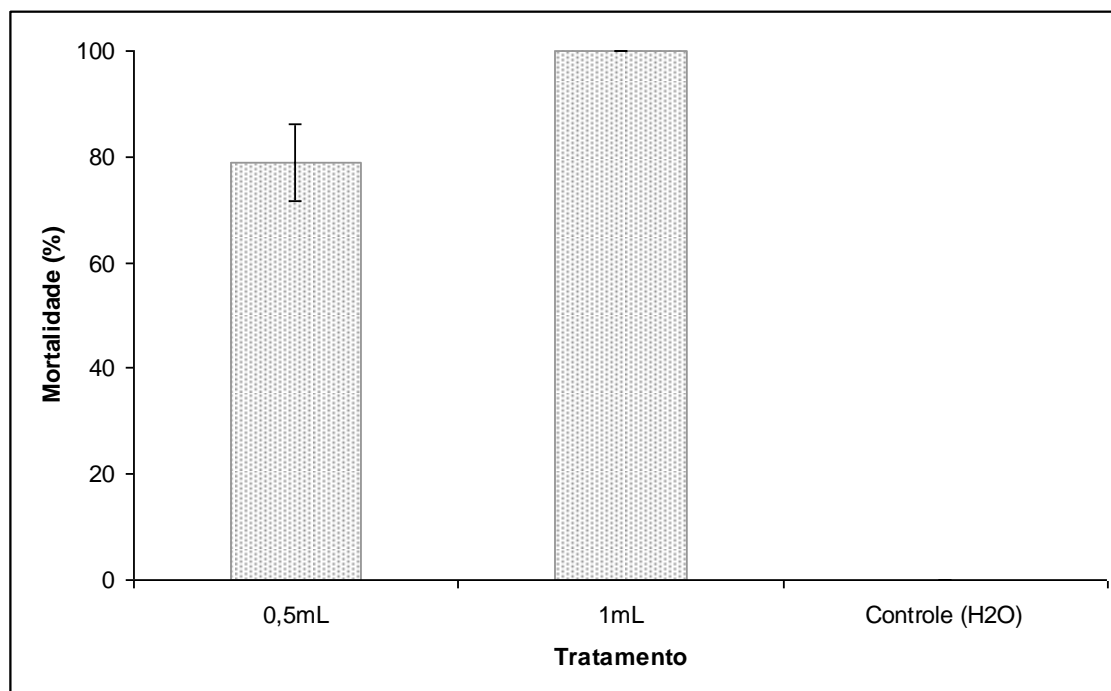
**Tabela 3.** Bioensaio usando 2mg das frações obtidas via HPLC.

Ensaio de atividade com frações provenientes de HPLC				
	Qtde de extrato	Nº de nematóides	H <sub>2</sub> O	Total
Controle H <sub>2</sub> O	0mg	200 (125µL)	1375µL	1,5mL
Controle ACN	330µL	200 (125µL)	1045µL	1,5mL
Controle Extrato cru	500µL	200 (125µL)	875µL	1,5mL
Fração 1	2mg	200 (125µL)	1370µL	1,5mL
Fração 2	2mg	200 (125µL)	1359µL	1,5mL
Fração 3	2mg	200 (125µL)	1260µL	1,5mL
Fração 4	2mg	200 (125µL)	1356µL	1,5mL
Fração 5	2mg	200 (125µL)	1275µL	1,5mL
Fração 6	2mg	200 (125µL)	1324µL	1,5mL
Fração 7	2mg	200 (125µL)	1304µL	1,5mL
Fração 8	2mg	200 (125µL)	1273µL	1,5mL

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste da atividade do extrato cru obtido a partir de sementes de *C. spectabilis* se deu por meio de bioensaios nos quais foram utilizadas as quantidades de 500 µL e 1000 µL do extrato cru sobre 100 J<sub>2</sub> de *M. incognita*. (Figura 1) O ensaio apresentou mortalidade de todos os 100 J<sub>2</sub> em ambas as concentrações usadas, após exposição de

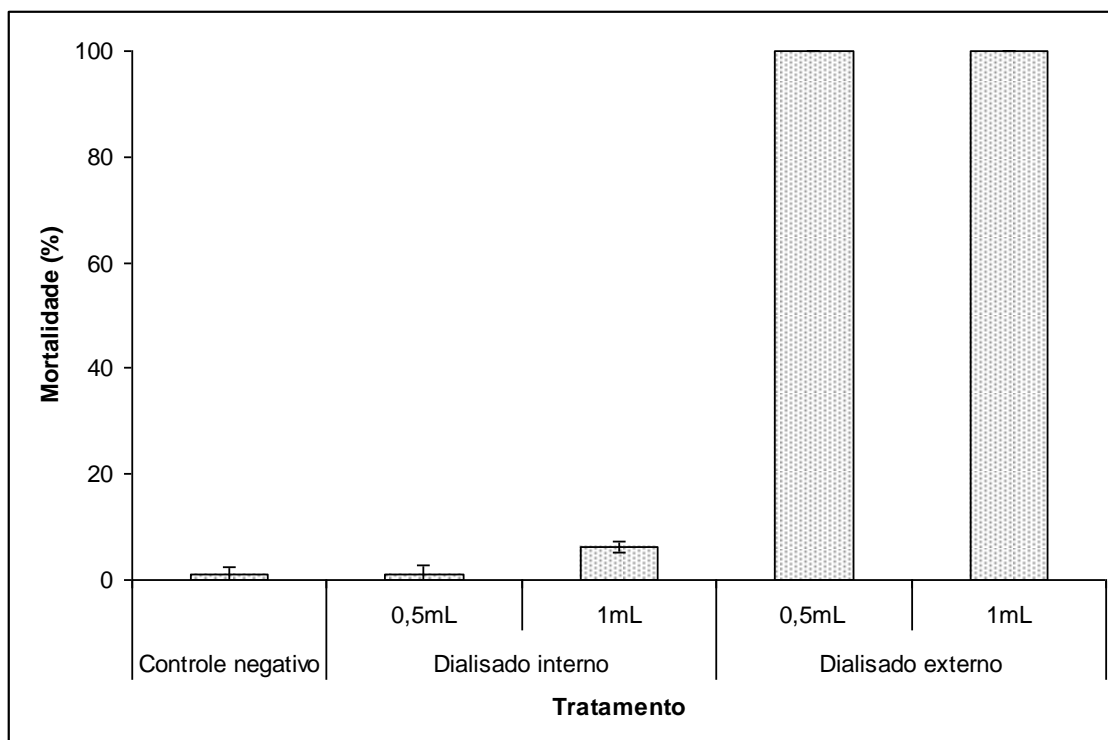
24h. Este resultado está em consonância com os dados da literatura especializada, segundo as quais a rotação de culturas, a incorporação de biomassa e a incorporação de sementes ao local de cultivo resultaram em diminuição da população de nematóides (SILVA et al., 2002; AMARAL et al., 2002).



**Figura 1.** Bioensaio exibindo efeito nematicida para diferentes volumes do extrato cru sobre juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *M. incognita*.

Após a confirmação de atividade do extrato cru, este foi submetido a fracionamento por diálise em membrana de 3,5 kDa, durante 12 horas. Foram obtidas duas frações, o DI e o DE. As duas frações foram submetidas a novos bioensaios contra *J2*. O resultado mostrou que a atividade

nematicida estava somente na fração contendo moléculas menores que 3,5 kDa, ou seja, no DE (Figura 2). Vale ressaltar que os *J2*, após o tratamento, foram colocados em H<sub>2</sub>O destilada durante 2 horas e continuaram imóveis, confirmando o efeito nematicida.

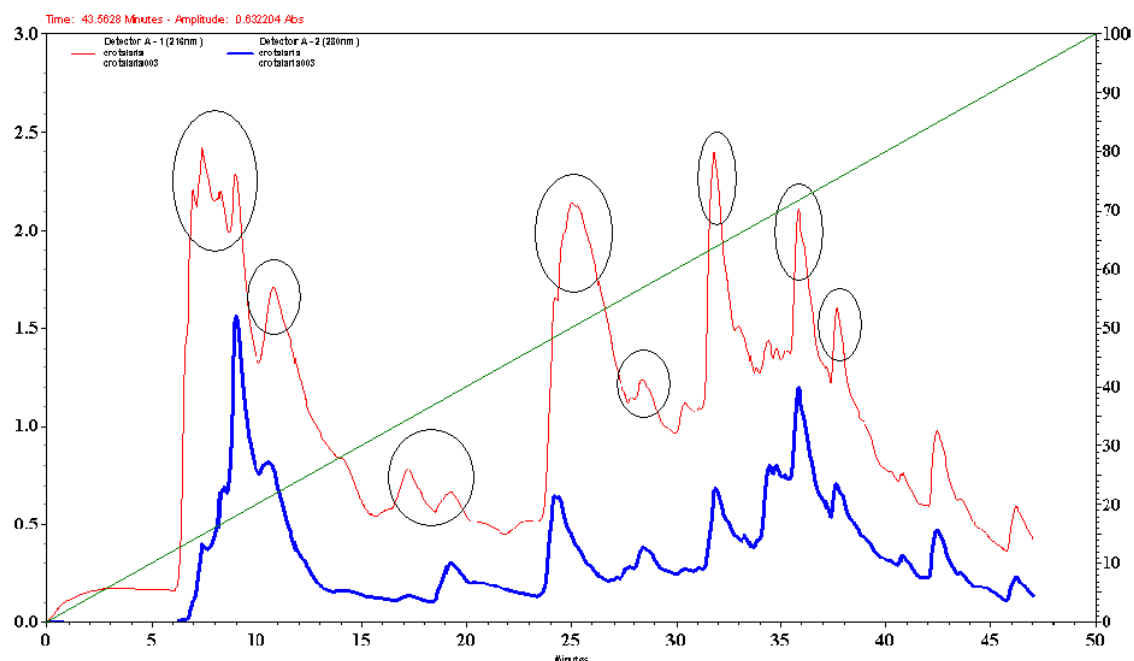


**Figura 2** – Bioensaios mostrando efeito nematicida das diferentes frações dialisadas em diferentes volumes de cada fração.

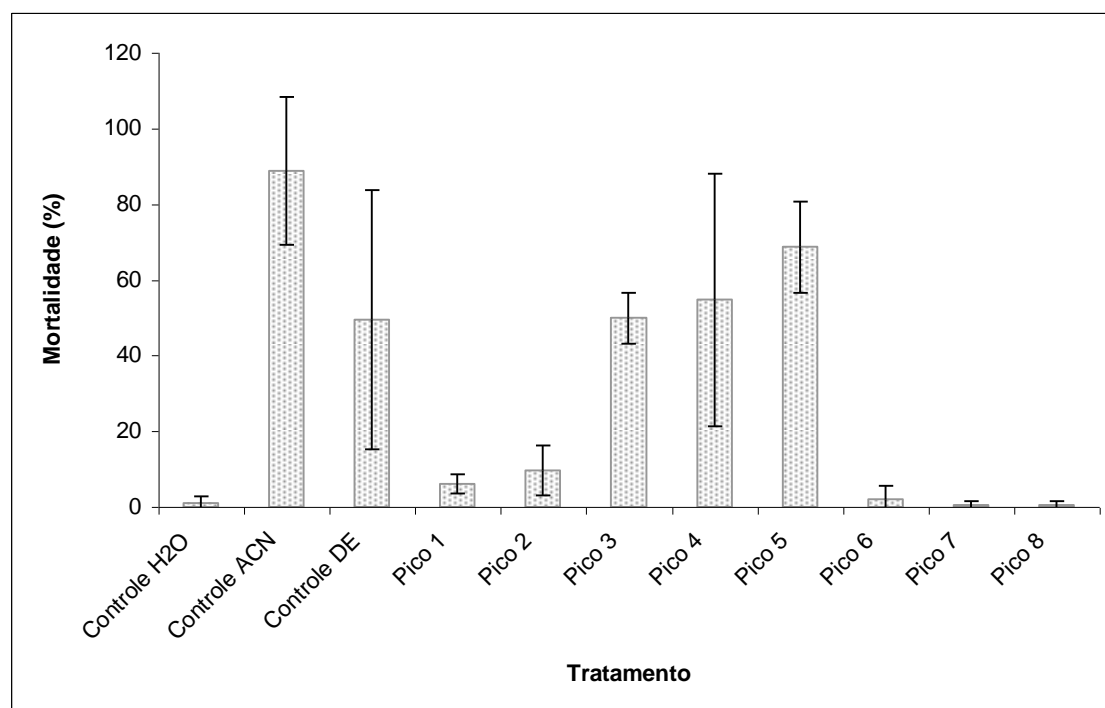
### Fracionamento do DE por HPLC

A análise por HPLC em coluna semi-preparativa, condicionada a gradiente linear de acetonitrila 0-100% do DE, mostrou a presença de 8 picos majoritários (Figura 3). Os resultados

do bioensaio mostraram atividade nematicida para os picos 3 e 4, e nematostática para o pico 5 (figura 4). Vale ressaltar que acetonitrila e extrato cru de DE foram usados como controles positivos, e H<sub>2</sub>O destilada como controle negativo (Figura 4).



**Figura 3** – Cromatograma de HPLC mostrando as 8 frações majoritárias de DE usadas nos ensaios.



**Figura 4** – Bioensaio usando 2mg das frações obtidas em HPLC mostrando atividade nematicida para os picos 3 e 4 e nematostática para o pico 5.

A visualização por microscopia de luz do efeito causado pelos compostos presentes nas frações 3 e 4 sobre J<sub>2</sub> de *M. incognita* revelou a

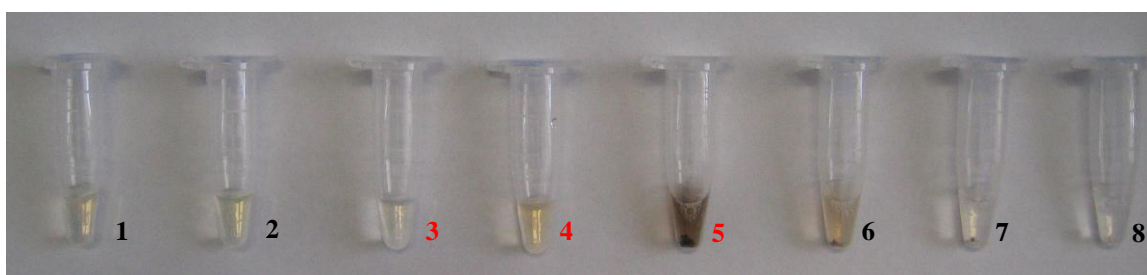
formação de vesículas no corpo do nematóides (Figura 5).



**Figura 5** – (A) Nematóide submetido a tratamento controle em H<sub>2</sub>O MilliQ. (B) e (C) nematóides apresentando vacúolos após exposição às frações ativas separadas por HPLC.

As 8 frações obtidas por HPLC, ao serem concentradas, apresentaram colorações distintas umas das outras. Tal fato sugere que

possivelmente elas pertençam a diferentes classes de compostos (Figura 6).



**Figura 6** – Diferentes colorações encontradas em frações providas do HPLC.

## CONCLUSÕES

O Presente trabalho mostrou que existem em *C. spectabilis* moléculas ativas contra nematóides. Essa atividade pode ser dividida em nematicida e nematostática. As diferentes colorações relativas às frações obtidas por HPLC indicam que essas moléculas pertencem a diferentes classes de compostos. Análises microscópicas revelaram a presença de grandes vesículas no interior do corpo do nematóide, sugerindo a ruptura de seu intestino. Estudos posteriores determinarão a eficiência do uso de tais substâncias no controle de nematóides, o que poderá ser uma alternativa natural e biodegradável aos atuais métodos, os quais vêm se mostrando danosos ao meio ambiente e ao homem.

## PERSPECTIVAS

Os próximos passos do trabalho serão a continuação do processo de purificação, realização de testes de citotoxicidade e termoestabilidade e, por fim, a elucidação da estrutura da molécula por Ressonância magnética nuclear (RMN).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. M.; ALMEIDA, R. G.; BOTTAN, F.; JUNG, R. F.; GERALDI, L.; MARQUES, C. A. G. Incidência de plantas espontâneas e severidade da queima-das-folhas em função do espaçamento nos sistemas de produção de cenoura de base ecológica e convencional. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p.1123-1126, 2007.

AMARAL, D. R.; OLIVEIRA, D. F.; CAMPOS, V. P.; CARVALHO, D. A. Efeitos de alguns extratos



- vegetais na eclosão, mobilidade, mortalidade e patogenicidade de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 43-48, 2002.
- BAKHETIA, M.; URWIN, P. E.; ATKINSON, H. J. Characterisation by RNAi of pioneer genes expressed in the dorsal pharyngeal gland cell of *Heterodera glycines* and the effects of combinatorial RNAi. **International Journal for Parasitology**. Oxford, Inglaterra, v. 38, n.13, p. 1589-1597, nov. 2008.
- BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; KIMURA, O.; DÖBEREINER, J. Bactérias fitopatogênicas fixadoras de N2 em associação com plantas. **Seropédica**: Embrapa-CNPAB, 1997. 25 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 41).
- BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 919 p. v. 1.
- BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 5.ed., São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2.
- BLUM, L. E. B. **Doenças de plantas**: conceitos básicos. [S.l.]: UDESC, 2002.
- CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, Calif, v. 40, p. 221-249, 2002.
- COSTABEBER, J. A. Bases epistemológicas e conceituais da agroecologia. In: CURSO DE NIVELAMENTO CONCEITUAL E METODOLÓGICO EM AGROECOLOGIA. Campinas: Embrapa Meio Ambiente, 2006.
- EMBRAPA. Levantamento exploratório 1: reconhecimento de solos do estado do Piauí. Rio de Janeiro, 1986.
- EMBRAPA. Solos do município de Uruçuí-PI. Disponível em: <<http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/index2.php>>. Acesso em: 28 de fevereiro. 2008.
- FÁVERO, C.; JUCKSCH, I.; ALVARENGA, R. C.; COSTA, L. M. Modificações na população de plantas espontâneas na presença de adubos verdes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 11, p. 1355-1362, nov. 2001.
- FERNANDES, K. V. S.; SABELLI, P. A.; BARRATT, D. H. P.; RICHARDSON, M.; XAVIER-FILHO, J.; SHEWRY, P. R. The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors. **Plant molecular biology**, Dordrecht, Holanda, NL, v. 23, n. 1, p. 215-219, 1993.
- FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. O Controle de Fitonematóides por plantas antagonistas e produtos naturais. **Sociedade Brasileira de Nematologia**, Piracicaba, SP, v. 24, n. 2, dez. 2000. Disponível em: <[www.ciagri.usp.br/~sbn](http://www.ciagri.usp.br/~sbn)>. Acesso em: 07 Abril 2008.
- FERREIRA NETO, A.; MONTEZUMA, M. C.; KAWAGUCHI, I. T.; PICOLI, R. **Eficácia do herbicida glifosato em aplicação única e sequencial dirigida no controle de plantas daninhas na cultura do algodão roundup ready**. São Paulo: Monsanto do Brasil, 2008.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz. Piracicaba, SP: FEALQ, 2002. 920 p. (FEALQ, Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 10).
- GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos**: mutações, câncer e reprodução. Brasília: UnB, 2005. 392 p.
- IMENES, S. D. L.; IDE, S. Principais grupos de insetos pragas em plantas de interesse econômico. **O Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 235-238, jul-dez, 2002.
- HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease reporter**, Washington, v. 57, n.12, p.1025-1028, Dec. 1973.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_200801comentarios.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200801comentarios.pdf)>. Acesso em: 28 fev. 2008.
- MARTINI, G.; PEDRINHO JUNIOR, A. F. F. P.; FELICI, G. V.; PIVA, F. M.; DURIGAN, J. C. Eficácia de uma nova formulação de glifosato para o controle de grama-seda (*cynodon dactylon*), em pomar de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**,

Cruz das Alamas, BA, v. 24, n. 3, p. 683-686, 2002.

MEYER, T. N.; RESENDE, I. L. C.; ABREU, J. C. Incidência de suicídios e uso de agrotóxicos por trabalhadores rurais em Luz (MG). **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, São Paulo, v. 32, n. 116, p. 24-30, 2007.

OMC. Statistics Database. Disponível em: <[www.wto.org](http://www.wto.org)>. Acesso em: 27 fev. de 2008.

REZENDE, G. C. Ocupação agrícola e estrutura agrária no cerrado: o papel do preço da terra, dos recursos naturais e da tecnologia. Disponível em: <[http://www22.sede.embrapa.br/unidades/uc/sg\\_e/ocupacao\\_agraria.pdf](http://www22.sede.embrapa.br/unidades/uc/sg_e/ocupacao_agraria.pdf)>. Acesso em: 01 jul. 2008.

ROSÁRIO, A. A. S.; BRILHANTE, M. O.; RODRIGUES, F. Q.; OLIVEIRA, W. S. A.; BRILHANTE, N. A.; PENEIREIRO, F. M. Avaliação técnica do plantio adensado em sistemas agroflorestais com relação ao controle de plantas espontâneas. Disponível em: <[http://www.sbsaf.org.br/anais/2004/pdfs/posters/secao\\_5/p10\\_09.pdf](http://www.sbsaf.org.br/anais/2004/pdfs/posters/secao_5/p10_09.pdf)>. Acesso em: 2008.

SILVA, G. S.; SOUZA, I. M. R.; CUTRIM, F. A. Efeito da incorporação de sementes trituradas de

Feijão de porco ao solo sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. 412-413, 2002.

SOSA, M. E.; TONN, C. E. Plant secondary metabolites from Argentinean semiarid lands: bioactivity against insects. **Phytochemistry Reviews**, Holanda, v. 7, n. 1, p. 3-24, 2008.

VERPOORTE, R.; HEIJDEN, R. V. D.; MEMELINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research**, London, v. 9, n. 4-5, p. 323-343(21), 2000.

WILLIAMSON, V. M. Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. **Annual Review of Phytopathology**, Palo alto, Calif, v. 36, p. 277-293, 1998.

WILLIAMSON, V. M.; GLEASON, C. A. Plant-nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 4, p.327-333, 2003.

YEA, X.; NG, T. B. A Chitinase with antifungal activity from the mung bean. **Protein Expression and Purification**, v. 40, n. 2, p. 230-236, 2005.

**Circular  
Técnica, 78**

**Ministério da  
Agricultura,  
Pecuária e  
Abastecimento**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372  
PABX: (61) 3448-4673 Fax: (61) 3340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição  
1ª impressão (2008):

**Comitê de  
Publicações**

**Presidente:** Miguel Borges  
**Secretária-Executiva:** Maria da Graça Simões Pires Negrão

**Membros:** Diva Maria de Alencar Dusi  
Luiz Adriano Maia Cordeiro  
José Roberto de Alencar Moreira  
Regina Maria Dechechi G. Carneiro  
Samuel Rezende Paiva

**Suplentes:** João Batista Tavares da Silva  
Margot Alves Nunes Dode

**Supervisor editorial:** Maria da Graça Simões Pires Negrão

**Normalização Bibliográfica:** Rosamares Rocha Galvão

**Expediente**

**Editoração eletrônica:** Maria da Graça Simões Pires Negrão

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

