



Instituto Politécnico de Coimbra

ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE COIMBRA

**Estudo das interacções entre *Solanum nigrum* e os
nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR), *Meloidogyne*
spp.**

Rita Sofia Cordeiro Agante

Relatório de Estágio Profissionalizante para obtenção do Grau de
Mestre em Agro-Pecuária

Júri:

Presidente: Doutoramento, Isabel Rosa Maria Lima de Brito Viana Andrade, Professora Adjunta do Departamento de Ciências Agronómicas, Escola Superior Agrária de Coimbra

Arguente: Doutoramento, Ivânia Sofia Grasina Esteves, Bolseira de Investigação no Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra

Orientador: Doutoramento, Maria José Moreno da Cunha, Professora Adjunta do Departamento de Ciências Agronómicas, Escola Superior Agrária de Coimbra

Orientador Externo: Doutoramento, Isabel Luci Pisa Mata da Conceição, Professora Auxiliar do Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra

Coimbra, 2015

AGRADECIMENTOS

Com a chegada do fim de uma das mais importantes, mas também mais difíceis, etapas da minha vida, quero desde já expressar o meu sincero agradecimento às pessoas que comigo colaboraram para a realização desta tese, a algumas destas de forma bastante especial.

Em primeiro às minhas orientadoras, Professora Doutora Isabel Luci Pisa Mata da Conceição e Professora Doutora Maria José Moreno da Cunha, pela disponibilidade, colaboração, ajuda e orientação prestada em todas as fases do trabalho.

A todas as pessoas do Laboratório de Nematologia da Universidade de Coimbra, pela partilha de conhecimentos e ajuda em algumas tarefas práticas.

A todos os professores da Escola Superior Agrária de Coimbra, que me ajudaram na aquisição de todos os conhecimentos adquiridos.

Aos meus pais, que permitiram a oportunidade de atingir mais um patamar a nível académico. A toda a família, especialmente, pelo carinho, apoio e palavras de ânimo e encorajamento, que serviram de estímulo a vencer obstáculos e chegar ao fim de mais uma etapa da minha vida académica.

A todos os amigos e amigas que, de forma directa ou indirecta, me ajudaram nesta fase.

A todos os que me ajudaram e deram o apoio fundamental nesta fase tão importante, bem como noutras situações,

Muito obrigada!

RESUMO

Os nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR), *Meloidogyne* spp., são pragas importantes das culturas, responsáveis por reduções significativas na quantidade e qualidade da produção agrícola. O seu controlo é difícil e muitos dos métodos utilizados são ineficazes. Estratégias alternativas de controlo com base biológica devem ser desenvolvidas para minimizar riscos para a saúde e ambiente, decorrentes da utilização de nematodocidas. Algumas plantas, como *Solanum nigrum*, libertam fitoquímicos naturais que apresentam propriedades nematodocidas e os seus exsudatos radiculares podem actuar como estimuladores/inibidores da eclosão e/ou afetar a mortalidade de jovens do segundo estágio (J2). Os objectivos deste trabalho foram avaliar o efeito dos exsudatos radiculares de *S. nigrum*, na eclosão e mortalidade de J2 de quatro isolados de *Meloidogyne* (*M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. ethiopica* e *M. javanica*) e averiguar a reprodução destes isolados em *S. nigrum*. A eclosão de J2 foi avaliada, diariamente, durante 15 dias e a sua mortalidade durante 8 dias com contagens às 3h, 6h e a cada 24 h de exposição aos exsudados. Os resultados sugerem que *S. nigrum* pode ter efeito na eclosão e mortalidade de isolados de *Meloidogyne*, ainda que sejam necessários mais ensaios. Esta planta espontânea existente em Portugal, parece ter potencial para o controlo de *Meloidogyne* spp.

Palavras-chave: Controlo biológico; Eclosão; Mortalidade; Nemátodes-das-Galhas-Radiculares; *Patogenicidade*; *Solanum nigrum*.

ABSTRACT

Root-knot-nematodes (RKN), *Meloidogyne* spp., are important crop pests and can cause reductions in the quantity and quality of agricultural production. Their control is difficult and many of the methods used are ineffective. Alternative strategies should be developed to minimize risks to health and environment resulting from the use of nematicides. Some plants have natural phytochemicals with nematicide properties and their root exudates may act as stimulators or inhibitors of hatching and/or cause mortality of second stage juveniles (J2). The objectives of this study were to evaluate the effects of *Solanum nigrum* root exudates on the hatching and mortality of four *Meloidogyne* isolates (*M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. ethiopica* and *M. javanica*) and to investigate the reproduction of these isolates in *S. nigrum*. The hatching of J2 was evaluated daily during 15 days. The mortality of J2 was evaluated during 8 days and counted after 3h, 6h and every 24 h of exposure to exudates. The results suggested that *S. nigrum* may have effect on the hatching and mortality of all *Meloidogyne* isolates tested, although, other tests should be conducted. This spontaneous plant, existing in Portugal, seems to have potential in the control of *Meloidogyne* spp. isolates.

Key-words: Biological control; Hatching; Mortality; Root-Knot Nematodes;; *Pathogenicity*; *Solanum nigrum*.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
I INTRODUÇÃO	1
II OBJECTIVOS.....	2
III REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. NEMÁTODES -DAS -GALHAS RADICULARES (NGR), <i>MELOIDOGYNE</i> SPP.	3
1.1 CICLO DE VIDA	3
1.2 ESTRAGOS CAUSADOS.....	7
1.3 CONTROLO	8
1.4 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS.....	9
2. <i>SOLANUM NIGRUM</i>	10
2.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	10
2.2 USO MEDICINAL	10
2.3 GERMINAÇÃO.....	11
IV MATERIAIS E MÉTODOS	12
1. OBTENÇÃO DAS PLANTAS	12
1.1 OBTENÇÃO DE TOMATEIROS	12
1.2 OBTENÇÃO DE <i>SOLANUM NIGRUM</i>	12
2. OBTENÇÃO, MANUTENÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	13
3. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS POR ELECTROFORESE	14
3.1 PREPARAÇÃO DO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO.....	14
3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PROTEICAS	14
3.3 PREPARAÇÃO DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA	15
3.3.1 Preparação dos moldes	15
3.3.2 Preparação do gel de separação	16
3.3.3 Preparação do gel de concentração.....	16

3.3.4	Preparação da tina de electroforese	17
3.3.5	Colocação das amostras proteicas no gel e corrida de electroforese.....	17
3.3.6	Coloração de esterases.....	17
3.3.7	Secagem e conservação dos géis.....	18
4.	EFEITOS DOS EXSUDATOS RADICULARES DE <i>SOLANUM NIGRUM</i> NA ECLOSÃO DE JOVENS DO SEGUNDO ESTÁDIO	18
4.1	OBTENÇÃO DOS EXSUDATOS	18
4.2	OBTENÇÃO DE OVOS COM JOVENS DO SEGUNDO ESTÁDIO	19
4.3	TESTES DE ECLOSÃO	19
4.4	AVALIAÇÃO DOS TESTES DE ECLOSÃO	20
5.	EFEITOS DOS EXSUDATOS RADICULARES DE <i>SOLANUM NIGRUM</i> NA MORTALIDADE DE JOVENS DO SEGUNDO ESTÁDIO	21
5.1	OBTENÇÃO DOS EXSUDATOS	21
5.2	OBTENÇÃO DE J2	22
5.3	TESTES DE MORTALIDADE	22
5.4	AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE	22
6.	RESISTÊNCIA/SUSCEPTIBILIDADE DE <i>SOLANUM NIGRUM</i> A <i>MELOIDOGYNE</i> SPP.	23
6.1	OBTENÇÃO DO INÓCULO	23
6.2	ENSAIOS DE PATOGENICIDADE	24
6.3	AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE	25
V	RESULTADO	26
1.	CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>MELOIDOGYNE</i> SPP. POR ELECTROFORESE	26
2.	EFEITOS DOS EXSUDATOS RADICULARES DE <i>SOLANUM NIGRUM</i> NA ECLOSÃO DE JOVENS DO SEGUNDO ESTÁDIO DE <i>MELOIDOGYNE</i> SPP.....	27
2.1.	Eclosão de J2 de <i>Meloidogyne arenaria</i>	28
2.2.	Eclosão de J2 de <i>Meloidogyne chitwoodi</i>	30
2.3.	Eclosão de J2 de <i>Meloidogyne ethiopica</i>	32
2.4.	Eclosão de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i>	33
3.	EFEITOS DOS EXSUDATOS RADICULARES DE <i>SOLANUM NIGRUM</i> NA MORTALIDADE DE JOVENS DO SEGUNDO ESTÁDIO DE <i>MELOIDOGYNE</i> SPP.	35
3.1.	Mortalidade de J2 de <i>Meloidogyne arenaria</i>	36
3.2.	Mortalidade de J2 de <i>Meloidogyne chitwoodi</i>	38
3.3.	Mortalidade de J2 de <i>Meloidogyne ethiopica</i>	40
3.4.	Mortalidade de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i>	42

4.	RESISTÊNCIA/SUSCEPTIBILIDADE DE <i>SOLANUM NIGRUM</i> A <i>MELOIDOGYNE</i> SPP.	44
4.1.	Reacção de <i>Solanum nigrum</i> a <i>Meloidogyne ethiopica</i>	44
4.2.	Reacção de <i>Solanum nigrum</i> a <i>Meloidogyne javanica</i>	46
VI	DISCUSSÃO	47
1.	EFEITOS DOS EXSUDATOS RADICULARES DE <i>SOLANUM NIGRUM</i> NA ECLOSÃO DE JOVENS DO SEGUNDO ESTÁDIO DE <i>MELOIDOGYNE</i> SPP.....	47
2.	EFEITOS DOS EXSUDATOS RADICULARES DE <i>SOLANUM NIGRUM</i> NA MORTALIDADE DE JOVENS DO SEGUNDO ESTÁDIO DE <i>MELOIDOGYNE</i> SPP.	49
3.	RESISTÊNCIA/SUSCEPTIBILIDADE DE <i>SOLANUM NIGRUM</i> A <i>MELOIDOGYNE</i> SPP.	50
VII	CONCLUSÕES	53
VIII	BIBLIOGRAFIA	54

LISTA DE FIGURAS

Figura I – Ciclo de vida de <i>Meloidogyne incognita</i> à escala de 50µm. A – Jovem de segundo estágio (J2) penetra a raiz; B – J2 migra entre as células até ao cilindro vascular da planta; C – O estilete do J2, representado na ponta de seta, perfura a parede celular da planta e liberta secreções do esófago e absorve nutrientes; D – Formação de células gigantes que fornecem alimento ao nematode; E – O nemátode desenvolve-se e se for macho migra para fora da raiz, se for fêmea produz ovos; F – Massa de ovos. Fonte: Abad <i>et al.</i> , (2008).	5
Figura II - Micrografia electrónica de <i>Meloidogyne</i> spp. Macho (à esquerda), fêmea (ao centro) e jovens do segundo estágio (J2) (à direita). Fonte: Eisenback & Hunt (2009).	6
Figura III - Planta de <i>Solanum nigrum</i> com cerca de 3-4 meses de idade.....	10
Figura IV - Plantas de <i>Solanum nigrum</i> com cerca de 1 mês.	11
Figura V – Preparação dos moldes para a electroforese com o sistema Mini- PROTEAN III da BIORAD.	15
Figura VI - Lixiviação sucessiva do solo de três vasos com plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Tropimech, para obtenção de exsudatos radiculares.	19
Figura VII - Ensaio para testes de eclosão com <i>Meloidogyne chitwoodi</i>	20
Figura VIII - Sistema radicular das plantas de <i>Solanum nigrum</i> infectadas com <i>Meloidogyne ethiopica</i>	24
Figura IX - Plantas de <i>Solanum nigrum</i> inoculadas com <i>Meloidogyne ethiopica</i> , desvasadas.	24
Figura XI- Gel de poliacrilamida do isolado de <i>Meloidogyne chitwoodi</i> (a). Padrão de <i>M. javanica</i> (b).	27
Figura XII - Gel de poliacrilamida do isolado de <i>Meloidogyne javanica</i>	27
Figura X Gel de poliacrilamida do isolado de <i>Meloidogyne arenaria</i> (a). Padrão de <i>M. javanica</i> (b)...	27
Figura XIII - Gel de poliacrilamida do isolado de <i>Meloidogyne ethiopica</i> (a). Padrão de <i>M. javanica</i> (b).	27
Figura XIV - Evolução da eclosão cumulativa de J2 de <i>Meloidogyne arenaria</i> , ao longo de 15 dias de exposição aos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo).	29
Figura XV - Evolução da eclosão cumulativa de J2 de <i>Meloidogyne chitwoodi</i> , ao longo de 15 dias de exposição aos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo).	31

Figura XVI – Evolução da eclosão cumulativa de J2 de <i>Meloidogyne ethiopica</i> , ao longo de 15 dias de exposição aos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo).	33
Figura XVII – Evolução da eclosão cumulativa de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> , ao longo de 15 dias de exposição aos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo).	35
Figura XVIII - Evolução da mortalidade cumulativa de J2 de <i>Meloidogyne arenaria</i> , ao longo de 3h, 6h e até 8 dias de exposição aos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo).....	37
Figura XIX - Evolução da mortalidade cumulativa de J2 de <i>Meloidogyne chitwoodi</i> , ao longo de 3h, 6h e até 8 dias de exposição aos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo).....	39
Figura XX - Evolução da mortalidade cumulativa de J2 de <i>Meloidogyne ethiopica</i> , ao longo de 3h, 6h e até 8 dias de exposição aos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo).	41
Figura XXI - Evolução da mortalidade cumulativa de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> , ao longo de 3h, 6h e até 8 dias de exposição aos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo).	43
Figura XXIII – Plantas de tomateiro <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Easy Peel (à esquerda) e de <i>S. nigrum</i> (à direita), infectadas com <i>Meloidogyne chitwoodi</i>	44
Figura XXII – Raiz de tomateiro <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Tropimech infectada com <i>Meloidogyne</i> spp., onde são visíveis as galhas e as massas de ovos.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Parâmetros de avaliação dos efeitos dos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech na eclosão dos isolados de <i>Meloidogyne</i> spp.....	21
Tabela II - Escala para determinação do índice de galhas (IG) e do índice de massas de ovos (IMO) (Taylor & Sasser, 1978).....	25
Tabela III - Escala para avaliação do grau de Resistência/Susceptibilidade (GR) tendo em conta o Índice de Galhas (IG) e o Factor de Reprodução (FR) (Sasser <i>et al.</i> ,1984).	26
Tabela IV- Efeito dos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo), na eclosão de J2 de <i>Meloidogyne arenaria</i> durante 15 dias de exposição aos exsudatos e valor σ (desvio padrão).....	28
Tabela V - Inibição da eclosão cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (%IECC) dos J2 de <i>Meloidogyne arenaria</i> para os exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> e <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Tropimech.	29
Tabela VI - Efeito dos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo), na eclosão de J2 de <i>Meloidogyne chitwoodi</i> durante 15 dias de exposição aos exsudatos e valor σ (desvio padrão).....	30
Tabela VII - Inibição da eclosão cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (%IECC) dos J2 de <i>Meloidogyne chitwoodi</i> para os exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech.....	31
Tabela VIII - Efeito dos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo), na eclosão de J2 de <i>Meloidogyne ethiopica</i> durante 15 dias de exposição aos exsudatos e valor σ (desvio padrão).....	32
Tabela IX - Inibição da eclosão cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (%IECC) dos J2 de <i>Meloidogyne ethiopica</i> para os exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech.....	33
Tabela X - Efeito dos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo), na eclosão de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> durante 15 dias de exposição aos exsudatos e valor σ (desvio padrão).....	34
Tabela XI - Inibição da eclosão cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (%IECC) dos J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> para os exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> e <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Tropimech.	35

Tabela XII - Efeito dos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo), na mortalidade de J2 de <i>Meloidogyne arenaria</i> após 3h, 6h e até 8 dias de exposição aos exsudatos e valor σ (desvio padrão).....	36
Tabela XIII – Mortalidade cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (%MCC) de J2 de <i>Meloidogyne arenaria</i> para os exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech.....	37
Tabela XIV - Efeito dos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo), na mortalidade de J2 de <i>Meloidogyne chitwoodi</i> após 3h, 6h e até 8 dias de exposição aos exsudatos e valor σ (desvio padrão).....	38
Tabela XV - Mortalidade cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (%MCC) de J2 de <i>Meloidogyne chitwoodi</i> para os exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech.	39
Tabela XVI - Efeito dos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo), na mortalidade de J2 de <i>Meloidogyne ethiopica</i> após 3h, 6h e até 8 dias de exposição aos exsudatos e valor σ (desvio padrão).....	40
Tabela XVII - Mortalidade cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (%MCC) de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> para os exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech.....	41
Tabela XVIII - Efeito dos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo), na mortalidade de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> após 3h, 6h e até 8 dias de exposição aos exsudatos e valor σ (desvio padrão).....	42
Tabela XIX - Mortalidade cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (%MCC) de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> para os exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech.....	43
Tabela XX - Índice de galhas (IG), índice de massas de ovos (IMO), densidade populacional final (Pf) \pm σ (desvio padrão) e factor de reprodução (FR) \pm σ (desvio padrão) em <i>Solanum nigrum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv. Easy Peel, inoculadas com 5000 ovos e J2 de <i>Meloidogyne ethiopica</i>	45
Tabela XXI - Avaliação do grau de Resistência/Susceptibilidade (GR), tendo em conta os estragos na planta hospedeira (IG) e a eficiência da planta hospedeira (FR), de <i>Solanum nigrum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv. Easy Peel, inoculadas com 5000 ovos e J2 de <i>Meloidogyne ethiopica</i>	45
Tabela XXII - Índice de galhas (IG), índice de massas de ovos (IMO), densidade populacional final (Pf) \pm σ (desvio padrão) e factor de reprodução (FR) \pm σ (desvio padrão) em <i>Solanum nigrum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech, inoculadas com 5000 ovos e J2 de <i>Meloidogyne javanica</i>	46
Tabela XXIII - Avaliação do grau de Resistência/Susceptibilidade (GR), tendo em conta os estragos na planta hospedeira (IG) e a eficiência da planta hospedeira (FR), de <i>Solanum nigrum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech, inoculadas com 5000 ovos e J2 de <i>Meloidogyne javanica</i>	47
Tabela XXIV - Eclosão dos J2 de <i>M. chitwoodi</i> , <i>M. arenaria</i> , <i>M. javanica</i> e <i>M. ethiopica</i> , nos exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech e na água.....	48

Tabela XXV - Inibição da eclosão cumulativa corrigida (pela fórmula de Abbott) dos J2 de <i>M. chitwoodi</i> , <i>M. arenaria</i> , <i>M.javanica</i> e <i>M. ethiopica</i> , em exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech, e classificação do efeito destes exsudatos radiculares.	49
Tabela XXVI - Mortalidade cumulativa corrigida (pela fórmula de Abbott) dos J2 de <i>M. chitwoodi</i> , <i>M. arenaria</i> , <i>M.javanica</i> e <i>M. ethiopica</i> , em exsudatos radiculares de <i>Solanum nigrum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech.....	50
Tabela XXVII - Índice de galhas (IG), índice de massas de ovos (IMO), factor de reprodução (FR) e avaliação do grau de Resistência/Susceptibilidade (GR), tendo em conta os estragos na planta hospedeira (IG) e a eficiência da planta hospedeira (FR), em <i>Solanum nigrum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv. Easypeel a <i>Meloidogyne ethiopica</i> e de <i>Solanum nigrum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech a <i>Meloidogyne javanica</i> , em plantas inoculadas com 5000 ovos e J2.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

APS – Persulfato de Amónio

°C – grau Celsius

cm – centímetro

cv. – cultivar

ADN – ácido desoxirribonucleico

et al. – *et alterum*

FR – factor de reprodução

g – grama

HCl – ácido clorídrico

IG – índice de galhas

IMO – índice de massas de ovos

J2 – jovem do segundo estágio

J3 – jovem do terceiro estágio

J4 – jovem do quarto estágio

L – litro

M – molar

M. – *Meloidogyne*

mA – miliampere

mg – miligrama

min – minuto

µg – micrograma

mL – mililitro

µL – microlitro

σ – desvio padrão

Nº – número

NaCl – cloreto de sódio

NaOCl – hipoclorito de sódio

h – hora

% – percentagem

%EC – percentagem da eclosão cumulativa

%IEC – percentagem da inibição da eclosão cumulativa

%IECC – percentagem da inibição da eclosão cumulativa corrigida

Pf – população final

Pi – população inicial

r.p.m. – *revolutions per minute* (rotações por minuto)

sp. – espécie

spp. – espécies

TEMED - Tetrametilenodiamina

Tris – 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

V – Volt

I INTRODUÇÃO

Os nemátodes são seres microscópicos e muitos deles habitam no solo e atacam as plantas, sendo responsáveis por inúmeros danos nas culturas agrícolas e prejuízos económicos ao produtor (Goulart, 2010). Os estragos provocados pelos nemátodes são responsáveis pela redução de 11% da produção agrícola a nível mundial, que se reflecte numa redução de milhões de toneladas por ano (Coyne *et al.*, 2007). Os nemátodes-das-galhas radiculares (NGR), *Meloidogyne* spp., podem levar a perdas de rendimento até 60% (Nchore *et al.*, 2011).

Em 1855, Berkeley, referiu pela primeira vez os NGR, quando observava danos causados por eles em pepinos (Mitkowski & Abawi, 2011). Os NGR estão distribuídos por todo o mundo e parasitam milhares de espécies de plantas superiores, incluindo as monocotiledóneas, dicotiledóneas, herbáceas e plantas lenhosas (Širca *et al.*, 2004), podendo ser encontrados em zonas de clima temperado e tropical (Caillaud *et al.*, 2008).

Só após a identificação dos nemátodes, responsáveis pelos estragos das culturas, podem ser avaliadas as medidas de controlo que devem ser tomadas. Estas medidas irão depender, também, da cultura, do sistema cultural utilizado e das circunstâncias locais (Coyne *et al.*, 2007).

Com a crescente preocupação de desenvolvimento de alternativas ao uso de pesticidas químicos, usados para reduzir os danos causados pelos inimigos das culturas, nomeadamente, os NGR, têm-se desenvolvido medidas de luta através da utilização de agentes biológicos em conjunto com cultivares de plantas que apresentem alguma resistência a estes nemátodes (Abrantes *et al.*, 2007). Algumas plantas têm a capacidade de libertar fitoquímicos naturais que apresentam propriedades nematodocidas. Os exsudatos radiculares destas plantas podem actuar como estimuladores ou inibidores da eclosão de jovens do segundo estágio (J2) (Conceição *et al.*, 2012). Devido ao reconhecimento pelas plantas da invasão pelo parasita, através da ruptura do tecido das raízes, dá-se como resposta uma libertação de substâncias nematodocidas (Ahmad *et al.*, 2010). Algumas das substâncias com princípios nematodocidas já identificadas nas plantas são substâncias como isotiocianatos, tiofenos, glicosídeos, alcalóides, compostos fenólicos e ácidos gordos (Haseeb & Butool, 1996). As plantas que possuem actividade nematodocida podem actuar como uma armadilha, matando o nemátode quando este invade as raízes, ou através do efeito de exsudatos fora da raiz (Ahmad *et al.*, 2010).

A espécie *Solanum nigrum*, em português chamada de Erva-Moura, é uma planta herbácea que pertence à família Solanaceae (kamgari, 2009). Esta é uma planta susceptível a doenças provocadas por fungos e nemátodes que provocam alterações das propriedades químicas da planta (Robab *et al.*, 2012).

II OBJECTIVOS

Neste trabalho, os objectivos consistiam em: i) avaliar o efeito dos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum* na eclosão e mortalidade de jovens do 2º estágio (J2) de quatro isolados de *Meloidogyne* (*M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. ethiopica* e *M. javanica*); ii) avaliar a resistência da mesma planta a estes isolados, de forma a poder contribuir para um eficiente controlo dos NGR através do desenvolvimento de estratégias de protecção com produtos naturais que possam ser alternativas à utilização de nematodocidas de síntese.

III REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. NEMÁTODES -DAS -GALHAS RADICULARES (NGR), *MELOIDOGYNE* SPP.

Todos os nemátodes fitoparasitas apresentam na sua constituição um estilete, cuja função consiste na injeção de secreções e ingestão de nutrientes a partir de células da planta hospedeira. Não apresentam uma estrutura óssea interna e a sua cutícula actua contra a pressão de turgescência interna, mantendo a forma corporal e facilitando a sua locomoção (Mitkowski & Abawi, 2011). Através do estilete estabelecem interação com as plantas hospedeiras, induzindo uma diferenciação das células das raízes em células de alimentação especializadas (Caillaud *et al.*, 2008).

No ano de 1887, Goeldi, descreveu *Meloidogyne exigua* e a partir daí, Chitwood estabeleceu o nome usado actualmente para os NGR. As espécies mais comuns e que apresentam maior importância a nível económico são *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. chitwoodi* e *M. graminicola* (Mitkowski & Abawi, 2011). As espécies *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. incognita* podem ser encontradas em todo o mundo, sendo que se encontram principalmente em zonas tropicais e subtropicais. A espécie *M. hapla* é encontrada, preferencialmente, em zonas de clima temperado e de maior altitude (Collange *et al.*, 2011).

1.1 CICLO DE VIDA

O ciclo de vida do nemátode é dividido em seis estádios (Coyne *et al.*, 2007) e é no estágio móvel, enquanto J2, que se torna possível ocorrer infecção (Williamson & Hussey, 1996).

O ciclo começa pelo ovo, de seguida tem quatro estádios juvenis e por fim atinge o estágio adulto (Coyne *et al.*, 2007). Entre cada estágio ocorre uma muda. À medida que a fêmea aumenta de volume a sua região posterior pode romper a epiderme da raiz e os ovos são depositados numa massa gelatinosa, que pode ser observada sem recorrer a ampliação, reiniciando-se assim o ciclo de vida dos NGR (Mitkowski & Abawi, 2011). Estas massas gelatinosas, produzidas por glândulas na zona rectal das fêmeas, têm como funções manter os

ovos unidos, conferir protecção contra condições ambientais extremas e predadores, possuindo ainda propriedades antimicrobianas (Moens *et al.*, 2009).

As massas de ovos encontram-se à superfície de raízes com galhas, embora possam também encontrar-se no interior do tecido das galhas. Estas são numa fase inicial macias, pegajosas e hialinas, mas com o seu desenvolvimento tornam-se mais firmes e com coloração mais escura (Moens *et al.*, 2009). Os ovos variam em tamanho e na forma, apresentando cerca de 95 µm de comprimento e 40 µm de diâmetro. A sua casca é composta por uma camada exterior vitelina, com cerca de 30 nm de espessura, por uma camada de quitina, com cerca de 400 nm de espessura, e por uma camada interna de glicolípidos com espessura variável. Esta última camada torna o ovo muito resistente a produtos químicos (Eisenback & Hunt, 2009). Dentro do ovo dá-se um fenómeno chamado de embriogénese, que consiste no desenvolvimento deste até ao 2º estágio juvenil (J2) (Moens *et al.*, 2009).

Os J2 são encontrados, normalmente, no solo e apresentam forma vermiforme, com comprimento até 500 µm e largura até 15 µm. Este é o estágio infectivo (Mitkowski & Abawi, 2011). A eclosão dos J2 depende de alguns factores, principalmente da temperatura e humidade. A sobrevivência destes nemátodes está associada a fenómenos fisiológicos e a adaptações bioquímicas, como atrasos na embriogénese e conteúdo em reservas lipídicas, que prolongam a viabilidade do J2 até este invadir um hospedeiro. Já no solo os J2 são vulneráveis e rapidamente necessitam de encontrar um hospedeiro sendo atraídos para as raízes. Após invadir o hospedeiro o J2 começa a sua alimentação e depois, após a diferenciação das células da planta em células especializadas, o nemátode torna-se sedentário e aumenta o seu volume. O J2 passa para o terceiro estágio (J3), após cerca de 14 dias, e de seguida, ao fim de 4-6 dias, passa para o quarto estágio juvenil (J4) e, por último, atinge o estágio adulto, também ao fim de 4-6 dias (Moens *et al.*, 2009) (Figura I).

Depois de entrarem nas raízes os J2 dos NGR fazem uma migração intercelular no cilindro vascular (Molinari & Baser, 2010). Alimentam-se de células vivas vegetais dentro das raízes das plantas que parasitam, onde posteriormente induzem a formação de galhas (Moens *et al.*, 2009), sendo este processo, de criação de células de alimentação, essencial para o seu desenvolvimento (Caillaud *et al.*, 2007). A alimentação do J2 nas células do floema e protofloema induz a diferenciação destas células em células especializadas. Após esta diferenciação, o nemátode torna-se sedentário e aumenta a sua forma. Quando estão no

estádio J3 e J4 não têm estilete funcional e, nestas duas fases, não se alimentam (Moens *et al.*, 2009).

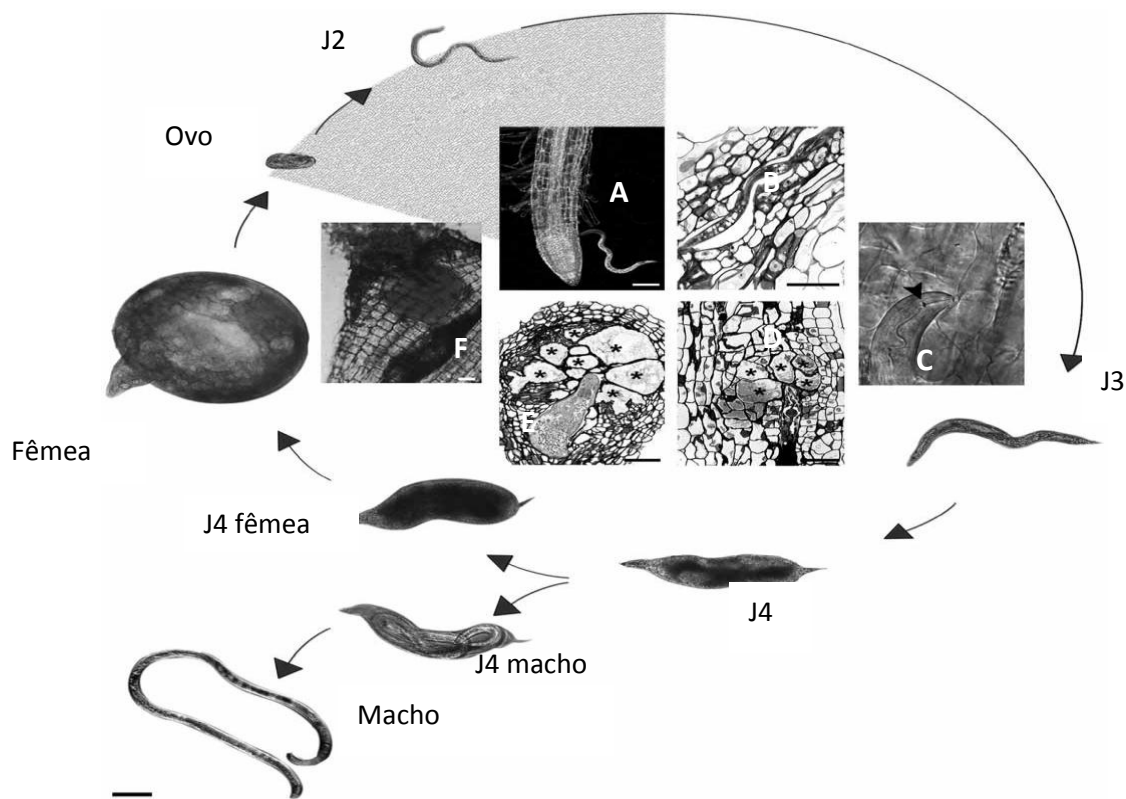


Figura I – Ciclo de vida de *Meloidogyne incognita* à escala de 50 μ m. A – Jovem de segundo estágio (J2) penetra a raiz; B – J2 migra entre as células até ao cilindro vascular da planta; C – O estilete do J2, representado na ponta de seta, perfura a parede celular da planta e liberta secreções do esôfago e absorve nutrientes; D – Formação de células gigantes que fornecem alimento ao nemátode; E – O nemátode desenvolve-se e se for macho migra para fora da raiz, se for fêmea produz ovos; F – Massa de ovos. Fonte: Abad *et al.*, (2008).

Os machos tornam-se vermiformes após a terceira muda e, assim, permanecem durante a quarta muda, para a fase adulta. Tornam-se móveis e emergem das cutículas para migrar para o solo. A parede do corpo e o sistema nervoso possibilitam-lhes que respondam a estímulos ambientais e se movam através do solo, ao encontro de uma fêmea para se reproduzirem (Moens *et al.*, 2009). O seu comprimento varia de 1100 a 2000 μ m, têm lábios bastante distintos e estiletes fortemente desenvolvidos. Por vezes podem ter uma cauda arredondada contundente e espículas visíveis que funcionam para o acasalamento (Mitkowski

& Abawi, 2011). Em espécies partenogénicas os machos são inexistentes ou raros e desnecessários para a reprodução (Moens *et al.*, 2009).

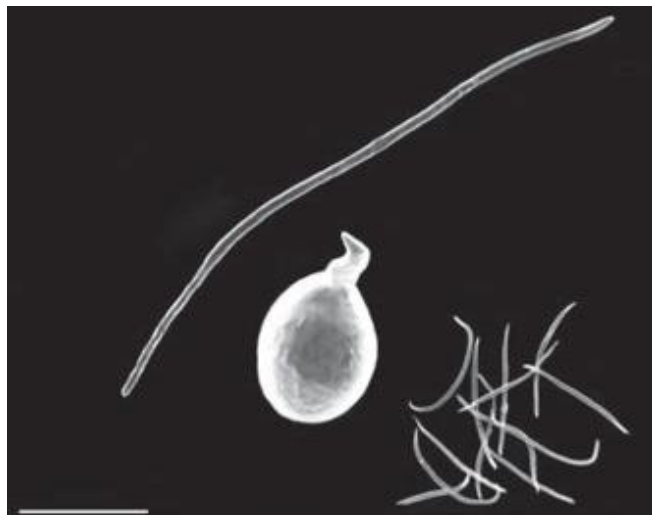


Figura II - Micrografia electrónica de *Meloidogyne* spp. Macho (à esquerda), fêmea (ao centro) e jovens do segundo estágio (J2) (à direita). Fonte: Eisenback & Hunt (2009).

A duração de cada um dos estádios e do ciclo de vida do nemátode varia consoante a espécie e alguns factores como temperatura, humidade e planta hospedeira (Coyne *et al.*, 2007).

As fêmeas são sedentárias, ainda que apresentem a região do pescoço musculosa, permitindo a mudança de posição da cabeça para que ela se alimente das diferentes células gigantes (Moens *et al.*, 2009). Quando estabelecem um local de alimentação, dentro da raiz da planta, tornam-se sedentárias naquele local. As fêmeas dos NGR têm forma globosa e o seu comprimento varia de 400 a 1000 μm (Mitkowski & Abawi, 2011) (Figura II).

O sistema digestivo está especializado para a manutenção das células gigantes e para extrair nutrientes da planta, funcionando o intestino como órgão de armazenamento para os nutrientes. Seis grandes células das glândulas rectais fazem o esvaziamento do seu conteúdo através do ânus, formando a matriz gelatinosa que rodeia os ovos à medida que estes são depositados pela vulva. Os dois ovários fazem contacto directo com o intestino, de modo a que os nutrientes armazenados se difundam através de membranas celulares para o desenvolvimento de oogónios e ovócitos em óvulos maduros (Moens *et al.*, 2009).

A morfologia da fêmea adulta tem muita importância na identificação das espécies de *Meloidogyne* (Eisenback *et al.*, 1980). O períneo, região em torno da vulva e ânus dos nemátodes fêmeas, exibe um padrão de sulcos e anelações diferente para cada espécie que permite, assim, a distinção entre espécies (Mitkowski & Abawi, 2011).

1.2 ESTRAGOS CAUSADOS

Os estragos dependem de diversos factores como a densidade populacional, a virulência apresentada pela espécie responsável pela infecção e a capacidade de resistência ou tolerância da planta hospedeira ao nemátode em causa (Coyne *et al.*, 2007). Alguns factores como o clima, a disponibilidade de água, as condições apresentadas pelo solo, bem como a sua fertilidade e a presença de outras pragas e doenças, são também influentes para os estragos causados (Coyne *et al.*, 2007). A densidade de plantas é outro factor que também está relacionado. À medida que a densidade de nemátodes aumenta num campo, o número de galhas por planta também irá aumentar, da mesma forma que um grande número de nemátodes próximo das raízes também resultará em galhas maiores (Mitkowski & Abawi, 2011).

Cada cultura reage de maneira diferente à presença dos NGR (Mitkowski & Abawi, 2011). As plantas afectadas sofrem uma desordem fisiológica e o rendimento da cultura, bem como a qualidade dos produtos, são afectadas (Pajović *et al.*, 2010). Na parte subterrânea o sintoma característico é a formação de galhas, comumente designadas de "nós", que podem ser visíveis em todo o sistema radicular das plantas infectadas e que se vão reflectir na não aceitação do produto por parte do consumidor (Mitkowski & Abawi, 2011).

Quanto à parte aérea, os sintomas observados não são facilmente visíveis, sendo semelhantes a outro qualquer problema que danifique o sistema radicular (Moens *et al.*, 2009). Os danos consistem em vários graus de nanismo, falta de vigor e murchidão, devidos a stresse hídrico. Estes danos devem-se à presença das galhas, que tornam a capacidade da planta absorver e transportar água e nutrientes limitada (Mitkowski & Abawi, 2011). Podem ainda ocorrer infecções secundárias provocadas por outros agentes patogénicos, que resultam, frequentemente, na decadência dos tecidos infectados por nemátodes (Moens *et al.*, 2009).

1.3 CONTROLO

O controlo de nemátodes pode ser feito utilizando vários métodos, tais como métodos químicos, físicos, culturais ou biológicos (Moreira *et al.*, 2009). As estratégias de luta devem ser eficazes, não ter efeito nocivo para o ambiente e outros organismos, evitando, sobretudo, o agravamento dos prejuízos causados (Abrantes *et al.*, 2007).

Até por volta de 1980 o controlo de nemátodes era feito, essencialmente, através de nematodocidas químicos que apresentavam bons resultados no combate do parasita e aumentavam, significativamente, o rendimento das culturas (Dabiré *et al.*, 2005). Porém, o controlo de nemátodes recorrendo a nematodocidas convencionais tem sofrido uma diminuição drástica, devido à toxicidade de muitos pesticidas sintéticos que actuam noutros organismos que não apenas os organismos alvo (Haseeb & Butool, 1996). Outro factor responsável por esta diminuição são as preocupações que pairam sobre os riscos ambientais e na saúde do Homem (Molinari & Baser, 2010), decorrentes da utilização destes produtos.

Algumas técnicas alternativas consistem no correcto manejo do solo, com incorporações de matérias orgânicas, fertilização, controlo biológico e métodos baseados em calor, entre outras (Collange *et al.*, 2011). O controlo biológico consiste na gestão de doenças e pragas das plantas através do auxílio de organismos vivos, tais como predadores e parasitas, que eliminam ou danificam os seus hospedeiros, e outros agentes que indirectamente possam influenciar o estabelecimento, a função e a sobrevivência de patógenos e pragas (Moens *et al.*, 2009). O uso de culturas de cobertura é outra estratégia utilizada, que tem como vantagens, para além de algumas serem antagónicas de nemátodes, a estabilização do solo superficial e a melhoria da qualidade do solo. Estas culturas podem ser cultivadas fora da época normal de crescimento da produção agrícola (Mitkowski & Abawi, 2011).

A utilização de cultivares resistentes aos nemátodes é uma das alternativas mais ambientalistas, segura e economicamente mais viável para o controlo destes, tendo melhor rendimento cultural quando comparadas com cultivares susceptíveis (Mukhtar *et al.*, 2014). Os métodos físicos, as práticas culturais e o controlo biológico não são poluentes para o meio ambiente, mas apresentam como desvantagem necessitarem de mais tempo para se tornarem eficazes (Moreira *et al.*, 2009). Devido aos riscos associados ao uso de pesticidas, o controlo biológico de doenças de plantas tem recebido atenção crescente (El-Shennawy *et al.*, 2013). O tratamento de plantas com vários agentes, tais como patógenos virulentos e não virulentos,

extratos vegetais e produtos químicos de síntese, pode levar à indução de resistência. Em plantas resistentes dá-se a morte celular localizada do tecido da raiz circundante ao nemátode, impedindo assim o seu desenvolvimento (Molinari & Baser, 2010).

As infestantes, comumente chamadas de ervas daninhas, são os principais concorrentes das plantas cultivadas por nutrientes, água, luz, fertilizantes e espaço (Ardakani & Mirinejad, 2013), podendo ser responsáveis por reduzir o rendimento das culturas até mais de 70% (Gharabadiyan *et al.*, 2012). A sua presença também pode servir como reservatório para agentes patogénicos de plantas (Gharabadiyan *et al.*, 2012), uma vez que podem ser portadoras de fitopatogénios, como é o caso de nemátodes, fungos e vírus (Ardakani & Mirinejad, 2013).

O forte potencial de algumas plantas e seus derivados, como alternativa ao uso tradicional de nematodocidas, tem sido alvo de estudo por muitos investigadores (Haseeb & Butool, 1996). Algumas plantas podem ser antagonistas naturais, por produzirem exsudatos com propriedades nematodocidas que são libertados através das raízes, diminuindo assim a população de nemátodes no solo. Outras, chamadas de plantas armadilha, são plantas que produzem exsudatos que atraem os nemátodes. Após a penetração dos nemátodes nas raízes, estas plantas devem ser destruídas, caso sejam susceptíveis, ou não permitem o desenvolvimento e sobrevivência de futuras gerações, se forem resistentes ao nemátode (Conceição *et al.*, 2012).

1.4 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS

A identificação de nemátodes não é fácil, principalmente quando numa mesma amostra se encontram duas ou mais espécies do mesmo género. A correcta identificação das espécies tem muita importância, pois erros na caracterização e identificação das espécies podem levar a inadequadas medidas de controlo (Abrantes *et al.*, 2004). Os caracteres que têm sido mais utilizados para a caracterização e identificação dos isolados de *Meloidogyne* são a análise morfológica dos padrões perineais das fêmeas (Coyne *et al.*, 2007) e os fenótipos de esterases não específicas, que são obtidos em géis de poli-acrilamida através da electroforese unidimensional (Abrantes *et al.*, 2007).

Algumas técnicas que utilizam o ADN também podem ser usadas para identificar diferentes espécies de NGR (Mitkowski & Abawi, 2011).

2. *SOLANUM NIGRUM*

2.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

A família Solanaceae é composta por cerca de 90 géneros e entre 2000 a 3000 espécies. Dentro desta família, o género *Solanum* é o maior e mais complexo, conhecendo-se mais de 1500 espécies, muitas delas com bastante importância económica (Edmonds & Chweya, 1995).

A *Solanum nigrum* é uma espécie anual com fenologia de primavera-verão (Monte & Tarquis, 1997), que apresenta porte erecto e ramos delicados (Rawania *et al.*, 2003). Esta planta tem folhas alternas profundas de cor verde e formato oval, com a margem recuada e são acuminadas, ou seja, têm terminação em ponta (Nirmal *et al.*, 2012) (Figura III). A baga tem um tamanho que varia de 6 a 8 mm de diâmetro e, por vezes, as folhas podem apresentar cor roxa (Khattak *et al.*, 2012).

Esta erva comum de vida curta, tem uma altura de 30-120 cm e folhas com 4-7,5 cm por 2-5 cm de largura (Khattak *et al.*, 2012). As suas flores têm coloração branca, com amarelo no centro e as suas bagas variam de cor verde, na fase inicial, para cor laranja ou preto quando estão maduras (Nirmal *et al.*, 2012). Esta planta cresce geralmente em zonas de clima temperado (Ding *et al.*, 2012) e é considerada como infestante em 61 países e como cultura em 37 (kamgari, 2009).



Figura III - Planta de *Solanum nigrum* com cerca de 3-4 meses de idade.

2.2 USO MEDICINAL

A *Solanum nigrum* é uma planta com bastante importância no uso medicinal (Robab *et al.*, 2012). Tem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antipiréticas, anti-tumorais, antiulcerogénicas, quimiopreventivas para o cancro, hepatoprotetoras e efeitos imunomoduladores (Rawania *et al.*, 2003). Esta planta tem, recentemente, atraído muita atenção devido à sua notável actividade anti-tumoral. É anti-proliferativa em muitas células de

tumores humanos, como é o caso dos tumores do cólon, mama, pulmão e células do hepatoma (Ding *et al.*, 2013).

2.3 GERMINAÇÃO

A germinação da *Solanum nigrum* é impulsionada na presença de alguns factores, principalmente de luz e de temperatura acima dos 15°C (Kremer & Lotz, 1998) (Figura IV). O conhecimento dos valores de temperatura óptima para a germinação desta espécie é fundamental para prever o seu tempo de emergência (Kamgari, 2009). Outros factores que também influenciam a germinação são a



Figura IV - Plantas de *Solanum nigrum* com cerca de 1 mês.

latitude, a altitude, a humidade do solo, os nutrientes presentes no solo, o tipo e a densidade da cobertura vegetal e a perturbação do habitat (kamgari, 2009).

A germinação das sementes de *S. nigrum* depende, ainda, do nível de dormência. Em sementes que apresentam baixo nível de dormência, a sua germinação dá-se a temperatura constante. Em sementes com diferentes níveis de dormência e na presença de temperaturas alternadas, resulta uma elevada percentagem de germinação (kamgari, 2009). Desta forma, a temperatura indicada para a germinação das sementes encontra-se entre os 15 e os 30°C sendo necessária uma variação alternada entre estes valores para quebrar a dormência a que estas podem estar sujeitas. Temperaturas constantes são usadas como forma de inibir ou até mesmo impedir a germinação (Edmonds & Chweya, 1995). Uma melhor germinação pode ser conseguida fazendo um pré-tratamento com frio ou fazendo uma aplicação de nitrato ou ácido giberélico (Kremer & Lotz, 1998).

IV MATERIAIS E MÉTODOS

1. OBTENÇÃO DAS PLANTAS

1.1 OBTENÇÃO DE TOMATEIROS

As plantas de tomateiro *Solanum lycopersicum* cv Tropimech e *Solanum lycopersicum* cv Easypeel foram usadas como testemunha nos ensaios realizados e também como hospedeiro para a manutenção dos isolados estudados. As sementes de tomateiro foram colocadas, durante 2 horas, num copo com água e de seguida transferidas para uma caixa de Petri com papel de filtro humedecido, sendo posteriormente colocadas numa estufa, no escuro, a 22°C. Após germinação, e quando apresentavam uma pequena raiz, foram envasadas com terra esterilizada. Os vasos foram colocados numa estufa com um fotoperíodo de 12 horas, com os valores de temperatura a variar entre 20-25°C e humidade relativa entre 70-75%. A sua rega foi diária, com água da torneira, e após 3 a 4 semanas as plantas apresentavam dois pares de folhas verdadeiras, apresentando o tamanho ideal para serem inoculadas com nemátodes.

1.2 OBTENÇÃO DE *SOLANUM NIGRUM*

Ao colocar as sementes de *Solanum nigrum* a germinar, verificou-se que se desenvolviam fungos durante a sua germinação, havendo necessidade de desinfetar as sementes antes de as colocar a germinar. Visto que esta espécie ainda não tinha sido utilizada para estudos no Laboratório de Nematologia, surgiu a necessidade de testar a sua germinação. Para isso, fez-se um pequeno estudo da germinação numa estufa a 22°C e repetiu-se o procedimento numa estufa com temperatura a variar entre os 20 e 25°C. Os ensaios foram realizados no escuro e com um fotoperíodo de 8 horas de luz por dia. Numa caixa de Petri foram colocadas 25 sementes sem qualquer desinfecção e noutra foram colocadas 25 sementes desinfectadas em 20mL de álcool a 70%, com agitação durante 6 minutos. Após os 6 minutos as sementes foram lavadas 5 vezes com água destilada e colocadas 2 horas em água antes de serem transferidas para uma caixa de Petri, com um papel de filtro humedecido, e colocadas numa estufa, no escuro. Para a desinfecção com recurso a Hipoclorito de Sódio,

colocaram-se 25 sementes num copo com 20mL de Hipoclorito de Sódio a 3% com agitação durante 15 minutos. Após os 15 minutos procedeu-se do mesmo modo que para as sementes desinfectadas com álcool. Para o estudo da germinação na presença de luz repetiram-se os processos descritos acima, usando também 25 sementes, e as caixas de Petri foram colocadas numa estufa com luz durante 8 horas. Concluiu-se que as sementes de *S. nigrum* germinaram melhor quando foram desinfectadas com álcool e na presença de luz. A passagem das sementes germinadas para os vasos, foi feita da mesma forma que para as sementes de tomateiro. Quando apresentavam uma pequena raiz foram envasadas com terra esterilizada e os vasos colocados numa estufa, com fotoperíodo de 12 horas, temperatura a variar entre 20-25°C e humidade relativa entre 70-75%. A sua rega foi diária, com água da torneira, e após 3 a 4 semanas as plantas apresentavam o tamanho ideal para serem inoculadas com nemátodes.

2. OBTENÇÃO, MANUTENÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DOS ISOLADOS

Para os ensaios foram utilizados quatro isolados de *Meloidogyne*, que se encontravam no Laboratório de Nematologia, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Os isolados pertenciam às espécies *M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. ethiopica* e *M. javanica*.

Para manter e multiplicar os isolados de *Meloidogyne* em laboratório, foi utilizado, como planta hospedeira, o tomateiro cv. Tropimech. Sessenta dias após a inoculação, com 10 massas de ovos de uma determinada espécie, os tomateiros foram desenvasados e as raízes lavadas, muito cuidadosamente, para não se perderem as massas de ovos, com água da torneira e colocadas em caixas de Petri. Após este procedimento procedeu-se à recolha de massas de ovos, que foi feita com o auxílio de duas pinças ao microscópio estereoscópico. Foram recolhidos conjuntos de 10 massas de ovos para blocos de vidro escavados. Os tomateiros, com dois pares de folhas verdadeiras, foram transplantados para vasos maiores onde foram feitos 3 orifícios em volta da raiz, com o auxílio de uma vareta. De seguida, as 10 massas de ovos foram distribuídas por estes orifícios e os orifícios tapados com solo.

Os tomateiros assim inoculados foram colocados numa estufa com fotoperíodo de 12 horas, valores de temperatura a variar entre 20-25°C e humidade relativa entre 70-75%. A sua

rega foi diária. Sessenta dias após a inoculação os tomateiros foram desvasados e os nemátodes recolhidos para a realização dos ensaios de eclosão, mortalidade e patogenicidade.

3. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS POR ELECTROFORESE

A caracterização dos isolados de *Meloidogyne* spp. foi feita através da análise dos padrões enzimáticos de esterases. Estes padrões foram obtidos por electroforese em géis de poliacrilamida (Laemmli, 1970; Esbenschade & Triantaphyllou, 1985a; b; Pais *et al.*, 1986).

3.1 PREPARAÇÃO DO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO

O tampão de extracção das esterases foi preparado com uma solução de Sacarose a 20% e Triton X-100 a 1%. Após a sua preparação este foi mantido no frigorífico até a sua utilização, para evitar contaminações.

3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PROTEICAS

As amostras proteicas, de cada um dos isolados de *Meloidogyne*, foram obtidas de fêmeas jovens. A partir de raízes infectadas, foram retiradas fêmeas jovens, que apresentassem coloração branca leitosa, para um bloco de vidro escavado com uma solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, com o auxílio de uma pinça de bicos finos. Depois, as fêmeas foram transferidas para tubos de hematócrito com uma das extremidades fechadas e com 5 µL de tampão de extracção. Foram preparados cinco tubos com 1 fêmea, dois tubos com 3 fêmeas e dois tubos com 5 fêmeas. Depois de transferir as fêmeas para o tubo, estas foram maceradas com um pistão para libertar as proteínas contidas e, imediatamente, congeladas a -20°C, até à sua utilização. Os extratos assim preparados podem permanecer congelados até a sua utilização por um período máximo de três meses. Após este período os extratos perdem a actividade enzimática.

Para a identificação dos padrões enzimáticos de esterases foi necessário adicionar em cada gel uma amostra de um isolado padrão da espécie *M. javanica*. O procedimento para a

preparação desta amostra proteica foi o mesmo descrito anteriormente e foram preparados tubos de hematócrito com 5 fêmeas cada.

Antes da electroforese, as amostras foram retiradas do congelador e foi feita uma centrifugação a 9969 r.p.m., durante 15 minutos, a -5°C . A centrífuga tinha sido arrefecida, previamente, durante 10 minutos a $-5^{\circ}\text{C}/1000$ r.p.m.

3.3 PREPARAÇÃO DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA

3.3.1 Preparação dos moldes

Na electroforese foi utilizado o sistema Mini-PROTEAN III (*Bio-Rad Laboratories*, E.U.A). Os géis de poliacrilamida foram feitos em moldes constituídos por duas placas de vidro, em que a placa interior tem dimensões de 7,3 cm por 10,2 cm e a placa exterior tem dimensões de 8,3 cm por 10,2 cm. Estas placas foram separadas por espaçadores de 0,75 mm de espessura.

Preparou-se o molde para os géis com as placas de vidro e os espaçadores correctamente colocados, de acordo com as instruções da BIORAD. De seguida, foram marcadas as placas de vidro mais pequenas com uma caneta de acetato, a cerca de 1,3 cm a partir do topo, e foram colocados os moldes no suporte (Figura V).



Figura V – Preparação dos moldes para a electroforese com o sistema Mini- PROTEAN III da BIORAD.

3.3.2 Preparação do gel de separação

O gel de separação a 7% foi preparado do seguinte modo: solução de poliacrilamida, cuja preparação para um volume final de 10 mL, para dois géis, foi feita adicionando 2,33 mL de Acrilamida/Bisacrilamida, 3,75 mL de Tris-HCL 1M ph=8,8 e 50 µL de TEMED (Tetrametilenodiamina). Depois de tudo bem misturado foi adicionada água destilada até preencher o volume de 10 mL, agitando muito bem e acrescentado 50 µL de APS (Persulfato de Amónio). O gel de separação foi depois vertido nos moldes entre as placas de vidro até ao traço marcado e, com uma seringa, foi colocado propanol no topo do gel de modo a que não houvesse contacto do ar com a solução e assim a polimerização fosse mais rápida, cerca de 10 minutos, à temperatura ambiente. Após a polimerização do gel de separação retirou-se o propanol do molde e lavou-se o gel várias vezes com água destilada, de forma a remover qualquer vestígio de propanol, preparando-se de seguida o gel de concentração a 3%.

3.3.3 Preparação do gel de concentração

O gel de concentração a 3% consiste numa solução de poliacrilamida, cuja preparação para um volume final de 5 mL, para dois géis, foi feita adicionando 0,5 mL de Acrilamida/Bisacrilamida, 1,25 mL de Tris-HCL 0,5M ph=6,8, e 25 µL de TEMED. Depois de tudo bem misturado foi adicionada água destilada até preencher o volume de 5 mL, agitou-se muito bem e foi adicionado 25 µL de APS. A solução foi vertida, com cuidado, nos moldes até ao topo e um pente de plástico foi inserido nesse gel, com o objectivo de formar os poços para receber as amostras proteicas, impedindo, também, que ocorresse contacto do gel com o ar. Os locais para aplicação das amostras, visíveis com a colocação do pente, foram marcados com uma caneta de acetato, tendo em atenção que o primeiro e o último poço do gel não são utilizados devido à possibilidade de poderem ocorrer algumas imperfeições na sua formação. A polimerização do gel ocorreu, à temperatura ambiente, em cerca de 20 minutos.

3.3.4 Preparação da tina de electroforese

Após a polimerização do gel de concentração, os pentes foram retirados, bem como o excesso de gel no topo das placas. O molde foi retirado do suporte e colocado na tina de electroforese, que foi cheia com uma solução tampão de electroforese (6,06g de Tris-base, 28,82g de Glicina e água destilada até perfazer 2000mL). As bolhas de ar que se formaram na base da tina foram retiradas com uma pipeta e os poços lavados com uma microseringa com solução tampão.

3.3.5 Colocação das amostras proteicas no gel e corrida de electroforese

Este processo iniciou-se colocando um pouco azul de bromofenol a 0,1% na microseringa, a que se adicionou a amostra proteica, sendo o conteúdo transferido para o respectivo poço. O processo foi repetido para as restantes amostras, lavando-se muito bem a microseringa com água, entre cada aplicação. Após o preenchimento dos poços com as amostras proteicas, e não esquecendo de colocar no 4º poço a amostra de referência, *M. javanica*, fechou-se a tina e ligaram-se os eléctrodos à fonte de alimentação, iniciando-se a corrida de separação, cujos parâmetros foram 15 min a 6 mA por gel e 60 min a 20 mA por gel. A corrida foi interrompida quando a linha formada pelo corante azul de bromofenol atingiu a extremidade inferior do gel de separação.

3.3.6 Coloração de esterases

A preparação da solução de coloração teve início 20 minutos antes do final da corrida. Esta solução é constituída pela junção de duas soluções, A e B. A solução A foi feita num frasco forrado a papel de alumínio onde se juntou 100mL de Tampão fosfato 0,2 M, Ph=7,2 a 60mg de *Fast Blue* RR. A solução B foi feita num copo juntando 1mL de Acetona a 80 mg de α – Naftil acetato. Depois das soluções preparadas, juntou-se a solução B com a solução A e, após agitação, a solução corante foi colocada em caixas de Petri. O suporte com os géis foi retirado da tina. As placas de vidro foram separadas com os espaçadores e os géis cortados no

canto inferior do lado por onde começou a aplicação das amostras proteicas. De seguida, os géis foram, cuidadosamente, transferidos para as caixas de Petri com a solução corante e incubados a 37°C, no escuro, durante cerca de 30 minutos. Por último, quando o gel estava corado, a solução corante foi substituída por água da torneira, para parar a reacção, e onde os géis permaneceram 24 h para retirar o excesso de corante.

3.3.7 Secagem e conservação dos géis

Para secar os géis, foram colocadas duas folhas de papel celofane em água destilada, até ficarem bem molhadas e de seguida mergulhadas em etanol a 20%. Uma das folhas foi colocada numa moldura do suporte de secagem dos géis, transferiram-se os dois géis, cuidadosamente com a ajuda de uma espátula, para essa folha, e colocou-se a segunda folha de papel por cima dos géis, fechando tudo com uma segunda moldura. O conjunto das molduras foi preso com molas, de modo a que as folhas se mantivessem esticadas, e posto a secar à temperatura ambiente, durante, pelo menos, 48 h. Quando secas, as folhas de papel celofane foram retiradas do suporte e, com uma tesoura, cortaram-se os géis já secos e identificaram-se as espécies de *Meloidogyne* presentes.

4. EFEITOS DOS EXSUDATOS RADICULARES DE *SOLANUM NIGRUM* NA ECLOSÃO DE JOVENS DO SEGUNDO ESTÁDIO

4.1 OBTENÇÃO DOS EXSUDATOS

Os exsudatos de *S. lycopersicum* cv. Tropimech e de *Solanum nigrum* foram obtidos por lixiviação sucessiva do solo de três plantas de cada espécie, segundo o método descrito por Shepherd (1986). Cada vaso, com os orifícios inferiores destapados, foi colocado num copo e ao primeiro vaso foi adicionado cerca de 1,5 L de água. O lixiviado obtido do primeiro vaso foi vertido para o vaso da segunda planta e o lixiviado obtido desta segunda planta foi vertido para o vaso da terceira planta (Figura VI). O lixiviado recolhido no final dos três vasos foi

filtrado através de papel de filtro Whatman n.º1, para reter restos de solo. Os exsudatos obtidos foram guardados em frascos escuros, no frigorífico a 4°C, até serem utilizados.



Figura VI - Lixiviação sucessiva do solo de três vasos com plantas de *Solanum lycopersicum* cv. Tropimech, para obtenção de exsudatos radiculares.

4.2 OBTENÇÃO DE OVOS COM JOVENS DO SEGUNDO ESTÁDIO

Para a obtenção dos ovos para os testes de eclosão, foram retiradas massas de ovos, de raízes de tomateiros cv. Tropimech infectadas, para uma lâmina escavada com água destilada, pelo método de Hussey & Barker (1973).

Ao microscópico estereoscópico, com o auxílio de duas pinças de bicos finos, os ovos foram separados com uma pestana fixa numa agulha e os que continham J2 no interior foram retirados para blocos de vidro escavados. Em cada bloco foram colocados cerca de 15 ovos.

4.3 TESTES DE ECLOSÃO

Para os testes de eclosão foram usadas 5 repetições para cada modalidade, *S. nigrum*, água destilada e *S. lycopersicum* cv. Tropimech, funcionando as duas últimas como controlo negativo e controlo positivo, respectivamente. Em cada bloco de vidro escavado foram

colocados 0,5 mL de exsudato radicular ou água destilada e 15 ovos com J2, sendo cada bloco de vidro uma repetição. Os ensaios decorreram no escuro com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Figura VII).



Figura VII - Ensaio para testes de eclosão com *Meloidogyne chitwoodi*.

4.4 AVALIAÇÃO DOS TESTES DE ECLOSÃO

Após o ensaio iniciado, cada bloco de vidro escavado foi observado ao microscópico estereoscópico em intervalos de 24 horas, durante 15 dias, para fazer a contabilização do número de J2 eclodidos. Os J2 eclodidos foram sendo retirados do bloco de vidro. Após os 15 dias, com o valor total de jovens eclodidos, calculou-se a eclosão percentual cumulativa, sendo depois estes valores convertidos em valores de inibição de eclosão percentual cumulativa, pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925):

$$I = 100 - E, \text{ em que:}$$

I = inibição da eclosão cumulativa (%)

E = eclosão cumulativa (%).

De seguida, foi calculado o valor de percentagem da inibição da eclosão cumulativa corrigida, em relação à inibição da eclosão cumulativa verificada na água destilada, usando a fórmula:

$$\text{Inibição da eclosão corrigida (\%)} = \frac{IEe - IEc}{100 - IEc} \times 100, \text{ em que:}$$

IEe = percentagem de inibição da eclosão cumulativa no exsudato radicular testado

IEc = percentagem de inibição da eclosão cumulativa ocorrida na água (controlo negativo)

Os resultados obtidos foram sujeitos a uma análise de variância (ANOVA) para avaliar a existência ou não de diferenças significativas. Finalmente para classificar os efeitos dos exsudatos radiculares na eclosão dos isolados de *Meloidogyne* usaram-se os parâmetros indicados na Tabela I.

Tabela I - Parâmetros de avaliação dos efeitos dos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum* e *S. lycopersicum* cv. Tropimech na eclosão dos isolados de *Meloidogyne* spp.

% de IECC*	Efeito do exsudato radicular
< -60	Muito Estimulador (---)
-37 a -59	Estimulador (--)
-11 a -36	Pouco Estimulador (-)
-10 a 10	Sem efeito (0)
11 a 36	Pouco Inibidor (+)
37 a 59	Inibidor (++)
> 60	Muito Inibidor (+++)

* % IECC - Percentagem da inibição da eclosão cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott

5. EFEITOS DOS EXSUDATOS RADICULARES DE *SOLANUM NIGRUM* NA MORTALIDADE DE JOVENS DO SEGUNDO ESTÁDIO

5.1 OBTENÇÃO DOS EXSUDATOS

Os exsudatos usados para a avaliação da mortalidade dos J2 de cada isolado de *Meloidogyne* foram obtidos da mesma forma mencionada para obtenção dos exsudatos para os testes de eclosão.

5.2 OBTENÇÃO DE J2

Os J2 necessários para os testes de mortalidade foram obtidos de massas de ovos retiradas de raízes de tomateiro cv. Tropimech infectadas. As massas de ovos foram recolhidas e colocadas num crivo de tecido de náilon, com 30 μm de malha, preso com um elástico a um anel de plástico e colocadas sobre um copo. Adicionou-se água da torneira até mergulhar as massas de ovos e o copo foi colocado, numa estufa, no escuro. Após 24 horas a água foi mudada e após 48 horas os J2 foram retirados, com uma pestana fixa numa agulha, para blocos de vidro escavados, de forma a assegurar que só eram utilizados J2 eclodidos nas últimas 24 horas.

5.3 TESTES DE MORTALIDADE

Para os testes de mortalidade foram usadas 5 repetições para cada tratamento. Em cada repetição foram colocados 0,5 mL de exsudato radicular ou água e 15 J2. Os ensaios decorreram, no escuro, com temperatura de $22\pm 2^\circ\text{C}$ e a água destilada e o exsudato radicular de tomateiro *S. lycopersicum* cv. Tropimech foram as testemunhas, negativa e positiva, respectivamente.

5.4 AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE

Após o ensaio montado, cada bloco escavado foi observado ao microscópio estereoscópico após 3h, 6h e de 24 em 24h, até completar 8 dias, para contabilizar o número de J2 mortos. Para a confirmação da mortalidade dos J2, os que se encontravam imobilizados foram transferidos para um bloco de vidro escavado com água ao qual foi adicionado 10 μL de uma solução de 1N de NaOCl. Se o J2 permanecia imóvel, durante 3 minutos, estaria morto, se se movesse, estaria vivo.

Após os 8 dias calculou-se a mortalidade percentual cumulativa através da fórmula de Abbott (Abbott, 1925), a partir dos valores obtidos para a mortalidade:

$$\text{Mortalidade cumulativa corrigida (\%)} = \frac{Me - Mt}{100 - Mt} \times 100, \text{ em que:}$$

Me = Mortalidade ocorrida no exsudato radicular testado

Mt = Mortalidade ocorrida na água (controlo negativo)

Os resultados obtidos foram sujeitos a uma análise de variância (ANOVA) para avaliar da existência ou não de diferenças significativas.

6. RESISTÊNCIA/SUSCEPTIBILIDADE DE *SOLANUM NIGRUM* A *MELOIDOGYNE* SPP.

Para a avaliação da patogenicidade de nemátodes nos hospedeiros devem ser utilizadas 5 a 10 repetições (Sasser *et al*, 1984). A patogenicidade de cada um dos isolados das espécies de *Meloidogyne* estudadas foi avaliada em plantas de *S. nigrum*, que foram envasadas em solo esterilizado e inoculadas com 5000 ovos cada. Como testemunhas foram inoculadas plantas de tomateiro *S. lycopersicum* cv. Tropimech ou *S. lycopersicum* cv. Easypeel com 5000 ovos cada. Para *M. ethiopica* foram inoculadas 7 plantas de *Solanum nigrum* e 7 plantas do controlo, *S. lycopersicum* cv. Easypeel. Para *M. javanica* foram inoculadas 5 plantas de *Solanum nigrum* e outras 5 do controlo *S. lycopersicum* cv. Tropimech.

6.1 OBTENÇÃO DO INÓCULO

A extração do inóculo foi feita de acordo com a metodologia proposta por Hussey & Barker (1973). Sessenta dias após a inoculação de tomateiros com massas de ovos, as plantas foram desvasadas e as raízes lavadas de forma a remover todos os restos de solo, com cuidado para que não se perdessem massas de ovos. De seguida, as raízes foram cortadas em fragmentos de, aproximadamente, 2 cm e colocadas num frasco de Erlenmeyer de 500 mL. Foi preparada uma solução de 200 mL de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5%, que foi adicionada ao Erlenmeyer e procedeu-se à agitação deste durante 3 min. Após os 3 min, a suspensão foi vertida sobre um crivo de 75 µm de malha inserido num crivo de 20 µm. Por

fim, lavaram-se bem as raízes com água da torneira para remover o hipoclorito de sódio. Os ovos e os J2 ficaram no crivo de 20 µm, sendo transferidos para um copo de vidro. As raízes que ficaram no crivo de 75 µm foram novamente transferidas para o Erlenmeyer, ao qual foram adicionados 200 mL de água da torneira e agitadas, repetindo-se todo o processo. Para a contabilização dos ovos e J2 extraídos foram feitas 3 contagens de 1 mL numa placa Doncaster. Fazendo-se a média das 3 contagens, determinou-se o volume de suspensão necessário para inocular cada planta com 5000 ovos e J2 (Sasser *et al.*, 1984).

6.2 ENSAIOS DE PATOGENICIDADE

As plantas inoculadas com 5000 ovos foram mantidas numa estufa com fotoperíodo de 12 h, temperatura de 20-25°C e humidade relativa de 70-75%, durante 60 dias. A rega foi diária, com água da torneira. Sessenta dias após a inoculação, as plantas foram desenvasadas e os sistemas radiculares lavados de forma a remover o solo sem se perder inóculo (Figura VIII e Figura IX). O solo utilizado para estes testes foi esterilizado durante 1 hora e 30 minutos a 120°C.



Figura IX - Plantas de *Solanum nigrum* inoculadas com *Meloidogyne ethiopica*, desenvasadas.



Figura VIII - Sistema radicular das plantas de *Solanum nigrum* infectadas com *Meloidogyne ethiopica*.

6.3 AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE

Quando as massas de ovos eram pequenas, cada sistema radicular foi submerso num copo com uma solução de Floxina B a 0,0015%, durante 15 min, seguindo o método de Hartman (1982). Esta solução de Floxina B é usada com o objectivo de tingir a massa gelatinosa em torno dos ovos sem que os J2 se tornem inviáveis (Hartman, 1982).

A avaliação da patogenicidade é determinada convertendo o número de galhas e de massas de ovos, presentes em cada sistema radicular, em índices de galhas (IG) e de massas de ovos (IMO) numa escala de 0-5, criada por Taylor & Sasser (1978) (Tabela II).

Tabela II - Escala para determinação do índice de galhas (IG) e do índice de massas de ovos (IMO) (Taylor & Sasser, 1978).

Nº de galhas e massas de ovos por sistema radicular	IG/IMO
0	0
1-2	1
3-10	2
11-30	3
31-100	4
>100	5

Para diferenciar a densidade populacional final (Pf) repetiu-se o procedimento de Sasser *et al.* (1984), utilizado para a obtenção do inóculo. Fazendo-se a média das 3 contagens em 1 mL e tendo em conta o volume total de suspensão, obteve-se o número total de ovos e J2 produzidos na planta.

O factor de reprodução (FR) indica a eficiência do hospedeiro e é a razão entre a densidade populacional final (Pf) e a densidade populacional inicial (Pi), expressas em número de ovos (Oostenbrink, 1966), segundo a fórmula:

$$FR = \frac{Pf}{Pi}, \text{ em número de ovos}$$

Os resultados obtidos foram sujeitos a uma análise de variância (ANOVA) para avaliar a existência ou não de diferenças significativas.

Com os valores de FR e de IG, fez-se a avaliação da patogenicidade através do grau de resistência ou susceptibilidade (GR), segundo a Tabela III, cujo esquema foi proposto por Sasser *et al.* (1984).

Tabela III - Escala para avaliação do grau de Resistência/Susceptibilidade (GR) tendo em conta o Índice de Galhas (IG) e o Factor de Reprodução (FR) (Sasser *et al.*, 1984).

Estragos na planta hospedeira (IG)	Eficiência da planta hospedeira (FR)	Grau de Resistência/susceptibilidade (GR)
≤2	≤1	R – Resistente
≤2	>1	T – Tolerante
>2	≤1	HS – Hipersusceptível
>2	>1	S – Susceptível

Se o sistema radicular apresentasse menos de 100 massas de ovos, as raízes eram coradas com fucsina ácida e era feita a análise dos estádios de desenvolvimento dos nemátodes no interior das raízes. Para se identificar o estágio do ciclo de vida do nemátode comparam-se as características morfológicas observadas com as referidas em Triantaphyllou & Hirschmann (1960).

V RESULTADO

1. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE *MELOIDOGYNE* SPP. POR ELECTROFORESE

A electroforese de enzimas comprovou que os isolados caracterizados pertenciam às espécies previamente identificadas e, que, portanto, ainda eram isolados puros não contaminados (Figuras X a XIII). Assim, os ensaios podem ser realizados.

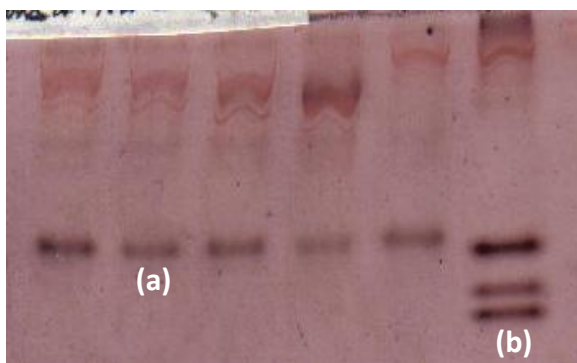


Figura X- Gel de poliacrilamida do isolado de *Meloidogyne chitwoodi* (a). Padrão de *M. javanica* (b).

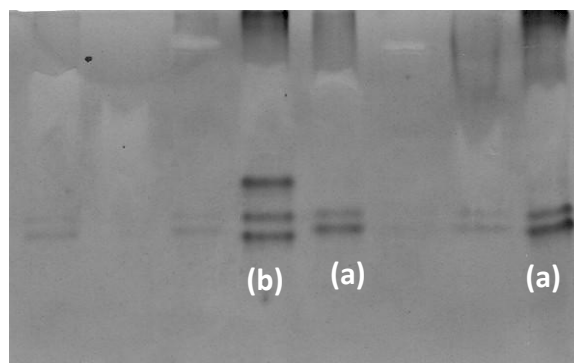


Figura XII Gel de poliacrilamida do isolado de *Meloidogyne arenaria* (a). Padrão de *M. javanica* (b).

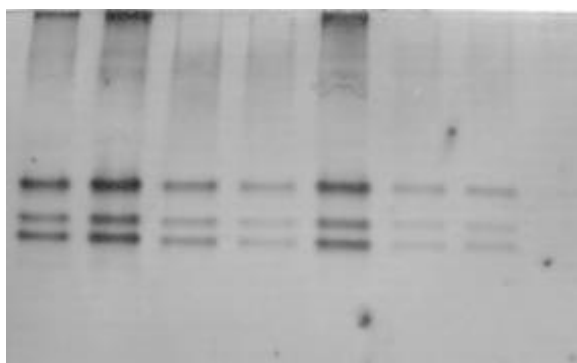


Figura XII - Gel de poliacrilamida do isolado de *Meloidogyne javanica*.

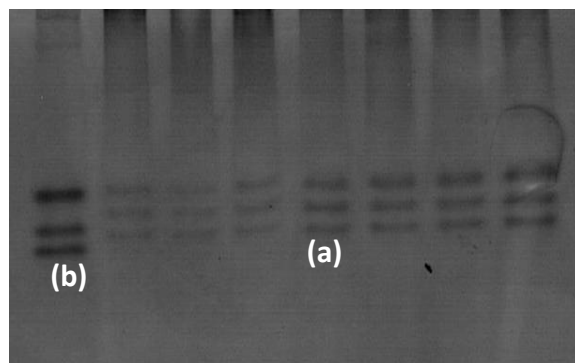


Figura XIII - Gel de poliacrilamida do isolado de *Meloidogyne ethiopica* (a). Padrão de *M. javanica* (b).

2. EFEITOS DOS EXSUDATOS RADICULARES DE *SOLANUM NIGRUM* NA ECLOSÃO DE JOVENS DO SEGUNDO ESTÁDIO DE *MELOIDOGYNE* SPP.

Os resultados referentes à percentagem de eclosão (%EC) dos isolados de *Meloidogyne* são apresentados em intervalos de 3 dias. Os números de J2 eclodidos nos exsudatos de *S. nigrum*, *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e na água (controlo negativo) foram bastante variáveis. A eclosão no controlo negativo foi superior à do controlo positivo, em todos os testes, excepto para *M. javanica* (Tabelas IV, VI, VIII e X). Estes resultados permitiram determinar a percentagem de inibição da eclosão cumulativa corrigida (%IECC) (Tabelas V, VII, IX e XI).

2.1. Eclosão de J2 de *Meloidogyne arenaria*

Quanto a *M. arenaria*, a %E de J2 variou de 0,6% a 5,5% em *S. nigrum*, de 1,9% a 6,9% no controlo positivo e de 2,3% a 9,8% no controlo negativo (Tabela IV). O maior número de J2 eclodidos, por intervalo de observações, verificou-se no controlo negativo (água), entre o 4º e o 6º dias (9,8%). No exsudato de *S. nigrum* foi nos três primeiros dias que se verificou maior número de J2 eclodidos (5,5%), o mesmo acontecendo no controlo positivo (6,9%). Nos controlos positivo e negativo foi observada, em uma réplica de cada, a eclosão total dos J2, enquanto em *S. nigrum* esta situação não foi verificada em nenhuma réplica. Foram detectadas diferenças significativas ($F = 8,090$; $gl = 2$; $P < 0,05$) entre o exsudato radicular de *S. nigrum*, de *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e a água (controlo negativo).

Tabela IV- Efeito dos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum*, *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo), na eclosão de J2 de *Meloidogyne arenaria* durante 15 dias de exposição aos exsudatos e valor σ (desvio padrão).

Exsudatos radiculares	Eclosão (%) a cada 3 dias					Eclosão cumulativa nos 15 dias (%)
	3	6	9	12	15	
<i>S. nigrum</i>	5,5±1,7	0,6±0,1	1,5±0,4	1,5±0,3	2,4±0,6	68,1±7,7
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	6,9±1,4	4,7±0,7	1,9±0,2	4,4±0,8	3,7±0,5	82,9±13,7
Água	8,8±1,0	9,8±0,6	4,9±0,2	2,9±0,3	2,3±0,3	92,3±5,5

A %EC de J2 de *M. arenaria* foi inferior em *S. nigrum* e superior na água, tal como observado na Figura XIV.

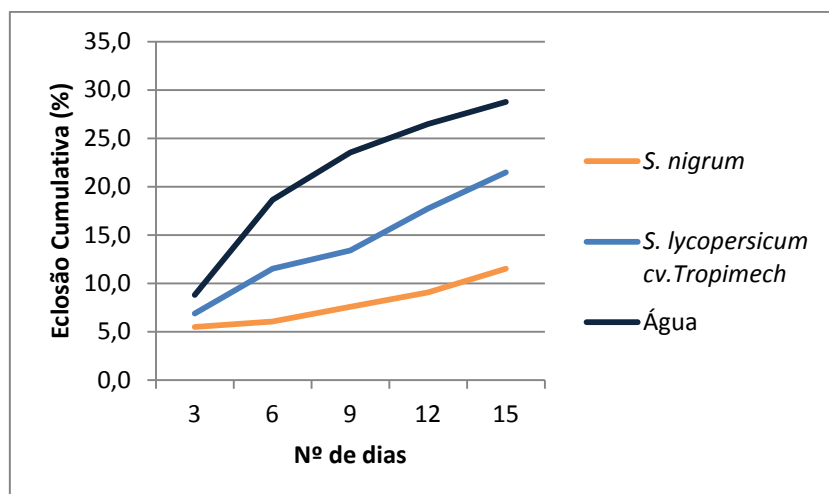


Figura XIV - Evolução da eclosão cumulativa de J2 de *Meloidogyne arenaria*, ao longo de 15 dias de exposição aos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum*, *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controle positivo) e água (controle negativo).

A %IECC dos J2 de *M. arenaria* em *S. nigrum* foi de 26,2%, enquanto no controle positivo foi de apenas 10,2%. Assim, o efeito do exsudato radicular para *S. nigrum* é considerado pouco inibidor e relativamente ao controle positivo considera-se não ter qualquer efeito (Tabela V).

Tabela V - Inibição da eclosão cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (%IECC) dos J2 de *Meloidogyne arenaria* para os exsudatos radiculares de *Solanum nigrum* e *Solanum lycopersicum* cv. Tropimech.

Exsudatos radiculares	%IECC	Efeito do exsudato radicular
<i>S. nigrum</i>	26,2	(+) Pouco Inibidor
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	10,2	(0) Sem efeito

2.2. Eclosão de J2 de *Meloidogyne chitwoodi*

Quanto a *M. chitwoodi*, a %E dos J2 variou de 2,7% a 8,7% em *S. nigrum*, de 0% a 14,5% no controlo positivo e de 3,8% a 8,0% no controlo negativo (Tabela VI). O período em que se observou um maior número de jovens eclodidos foi entre o 13º e o 15º dias (14,5%) no controlo positivo, *S. lycopersicum* cv.Tropimech. Nos exsudatos de *S. nigrum* foi entre o 10º e 12º dias que se verificou o maior número de J2 eclodidos (8,7%), o mesmo acontecendo no controlo negativo (8,0%). Nos controlos positivos e negativo foi observada, em algumas repetições, a eclosão total dos J2, enquanto em *S. nigrum* não foi verificada a eclosão total dos J2 em nenhuma repetição. Não foram detectadas diferenças significativas ($F = 1,071$; $gl = 2$; $P > 0,05$) entre o exsudato radicular de *S. nigrum*, o de *S. lycopersicum* cv.Tropimech (controlo positivo) e a água (controlo negativo).

Tabela VI - Efeito dos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum*, *S. lycopersicum* cv.Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo), na eclosão de J2 de *Meloidogyne chitwoodi* durante 15 dias de exposição aos exsudatos e valor σ (desvio padrão).

Exsudatos radiculares	Eclosão (%) a cada 3 dias					Eclosão cumulativa nos 15 dias (%)
	3	6	9	12	15	
<i>S. nigrum</i>	3,3±0,5	2,7±0,3	3,8±0,6	8,7±0,8	3,8±0,4	67,3±14,1
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	6,8±1,0	1,6±0,3	1,6±0,3	0,0±0,0	14,5±0,5	71,5±30,7
Água	6,9±1,0	4,2±0,7	6,6±0,5	8,0±0,1	3,8±0,4	87,4±20,5

No Figura XV observamos que a %EC de J2 de *M. chitwoodi* foi menor em *S. nigrum* comparando com os controlos negativo e positivo, sendo superior na água, controlo negativo.

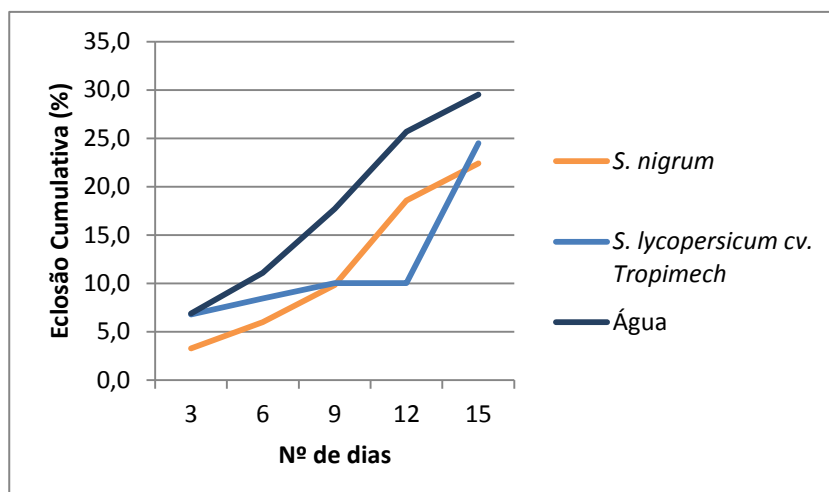


Figura XV - Evolução da eclosão cumulativa de J2 de *Meloidogyne chitwoodi*, ao longo de 15 dias de exposição aos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum*, *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controle positivo) e água (controle negativo).

A %IECC dos J2 de *M. chitwoodi* em *S. nigrum* foi de 23,0%, valor superior ao do controle positivo, que foi apenas de 18,3%, sendo ambos os exsudatos classificados como pouco inibidores da eclosão (Tabela VII).

Tabela VII - Inibição da eclosão cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (%IECC) dos J2 de *Meloidogyne chitwoodi* para os exsudatos radiculares de *Solanum nigrum* e *S. lycopersicum* cv. Tropimech.

Exsudatos radiculares	%IECC	Efeito do exsudato radicular
<i>S. nigrum</i>	23,0	(+) Pouco Inibidor
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	18,3	(+) Pouco Inibidor

2.3. Eclosão de J2 de *Meloidogyne ethiopica*

A %E de J2 de *M. ethiopica*, variou ao longo do tempo de 4,4% a 7,9% em *S. nigrum*, de 3,7% a 9,3% no controlo positivo e de 2,7% a 11,4% na água (Tabela VIII). O maior número de J2 eclodidos, por intervalo de observações, foi verificado no controlo negativo (11,4%), no controlo positivo (9,3%) e em *S. nigrum* (7,9%), nos três primeiros dias. Nos controlos positivo e negativo observou-se, em mais de uma réplica, a eclosão total dos J2, contrariamente ao observado com os outros isolados de *Meloidogyne* estudados. Não foram detectadas diferenças significativas ($F = 2,012$; $gl = 2$; $P > 0,05$) entre o exsudato radicular de *S. nigrum*, de *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e a água (controlo negativo).

Tabela VIII - Efeito dos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum*, *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo), na eclosão de J2 de *Meloidogyne ethiopica* durante 15 dias de exposição aos exsudatos e valor σ (desvio padrão).

Exsudatos radiculares	Eclosão (%) a cada 3 dias					Eclosão cumulativa nos 15 dias (%)
	3	6	9	12	15	
<i>S. nigrum</i>	7,9±0,5	7,0±0,8	7,0±0,9	4,4±0,1	4,4±1,0	92,4±6,3
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	9,3±1,2	8,4±1,5	3,7±0,3	5,3±0,9	5,9±0,9	97,3±6,0
Água	11,4±1,3	7,8±0,2	8,2±0,4	2,7±0,7	2,7±0,4	98,8±2,8

Na Figura XVI observa-se que a %EC de J2 de *M. ethiopica* foi, até aos 6 primeiros dias de exposição aos exsudatos radiculares, menor em *S. nigrum*. No entanto, após 15 dias de observações foi em *S. lycopersicum* cv. Tropimech que houve menor eclosão. Foi na água que se observou maior eclosão ao longo de todo o ensaio.

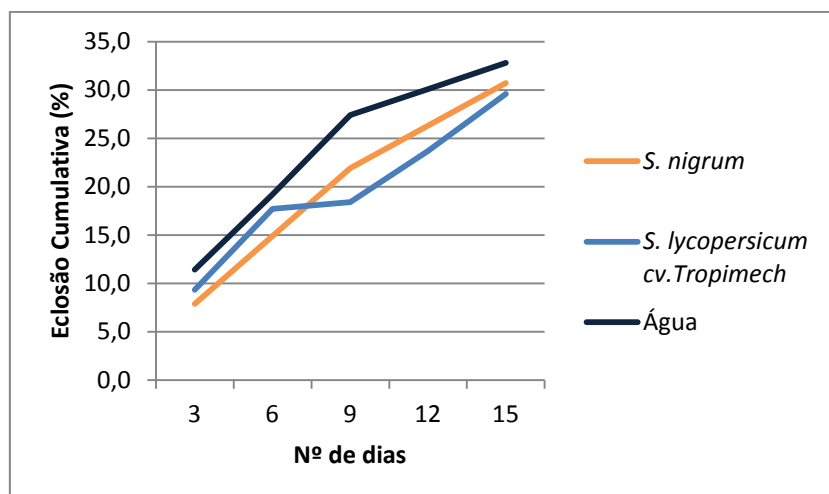


Figura XVI – Evolução da eclosão cumulativa de J2 de *Meloidogyne ethiopica*, ao longo de 15 dias de exposição aos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum*, *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controle positivo) e água (controle negativo).

A %IECC dos J2 de *M. ethiopica* em *S. nigrum* foi de 6,5%, sendo menor no controle positivo (1,4%). Nenhum dos dois exsudatos teve efeito na %IECC (Tabela IX).

Tabela IX - Inibição da eclosão cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (%IECC) dos J2 de *Meloidogyne ethiopica* para os exsudatos radiculares de *Solanum nigrum* e *S. lycopersicum* cv. Tropimech.

Exsudatos radiculares	%IECC	Efeito do exsudato radicular
<i>S. nigrum</i>	6,5	(0) Sem efeito
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	1,4	(0) Sem efeito

2.4. Eclosão de J2 de *Meloidogyne javanica*

Para *M. javanica*, a %E de J2 variou de 0,5% a 11,1% em *S. nigrum*, de 2,3% a 9,8% no controle positivo (*S. lycopersicum* cv. Tropimech) e de 1,7% a 15,8% no controle negativo (água) (Tabela X). O maior número de J2 eclodidos, por intervalo de observações, verificou-se no controle negativo, nos três primeiros dias (15,8%). Em *S. nigrum* foi, também, nos três

primeiros dias que se verificou maior número de J2 eclodidos (11,1%). No controlo positivo foi entre o 10º e 12º dias (9,8%). Nos controlos positivo e negativo foi observada, em uma réplica de cada, a eclosão total dos J2, enquanto em *S. nigrum* esta situação não foi verificada em nenhuma réplica. Não foram detectadas diferenças significativas ($F = 3,405$; $gl = 2$; $P > 0,05$) entre o exsudato radicular de *S. nigrum*, o de *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e a água (controlo negativo).

Tabela X - Efeito dos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum*, *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo), na eclosão de J2 de *Meloidogyne javanica* durante 15 dias de exposição aos exsudatos e valor σ (desvio padrão).

Exsudatos radiculares	Eclosão (%) a cada 3 dias					Eclosão cumulativa nos 15 dias (%)
	3	6	9	12	15	
<i>S. nigrum</i>	11,1±3,0	0,5±0,1	6,3±1,3	5,3±1,4	2,1±0,3	70,4±19,4
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	6,1±1,0	2,3±0,3	9,1±0,6	9,8±1,6	3,8±0,4	93,2±5,9
Água	15,8±3,4	3,4±0,9	5,6±0,2	4,0±1,1	1,7±0,3	87,8±10,7

Na Figura XVII observamos que a %EC de J2 de *M. javanica* nos primeiros 9 dias de exposição aos exsudatos radiculares, foi menor no exsudato radicular de *S. lycopersicum* cv. Tropimech e superior na água. Após 15 dias observamos que em *S. nigrum* eclodiram menos J2 do que nos controlos e que foi no controlo positivo que eclodiu um maior número de J2.

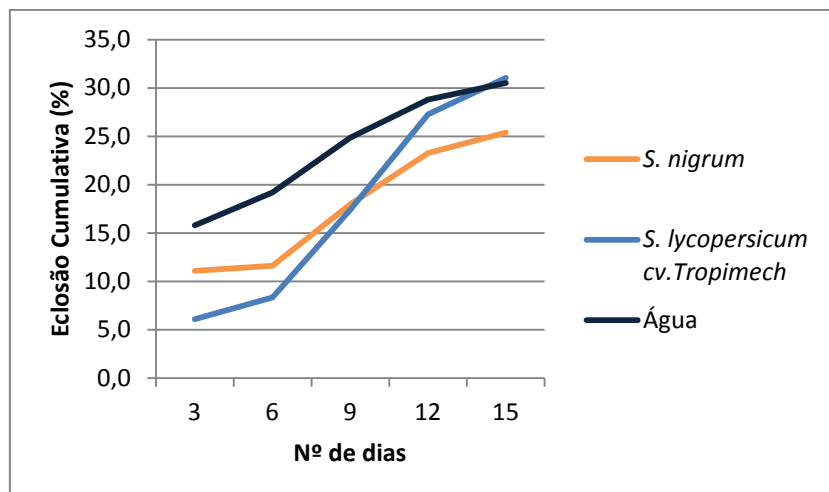


Figura XVII – Evolução da eclosão cumulativa de J2 de *Meloidogyne javanica*, ao longo de 15 dias de exposição aos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum*, *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controle positivo) e água (controle negativo).

A %IECC dos J2 de *M. javanica* em *S. nigrum* foi de 19,8% e no controle positivo foi negativa (-6,1%). Assim, *S. nigrum*, quanto ao efeito do seu exsudato radicular, é considerada pouco inibidora e o controle positivo como não tendo efeito (Tabela XI).

Tabela XI - Inibição da eclosão cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (%IECC) dos J2 de *Meloidogyne javanica* para os exsudatos radiculares de *Solanum nigrum* e *Solanum lycopersicum* cv. Tropimech.

Exsudatos radiculares	%IECC	Efeito do exsudato radicular
<i>S. nigrum</i>	19,8	(+) Pouco Inibidor
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	-6,1	(0) Sem efeito

3. EFEITOS DOS EXSUDATOS RADICULARES DE *SOLANUM NIGRUM* NA MORTALIDADE DE JOVENS DO SEGUNDO ESTÁDIO DE *MELOIDOGYNE* SPP.

Os resultados referentes à percentagem de mortalidade cumulativa (%MC) dos J2 das espécies de *Meloidogyne* em estudo, nos exsudatos de *S. nigrum* e *S. lycopersicum* cv

Tropimech (controlo positivo) e na água (controlo negativo), são apresentados após 3h, 6h e até 8 dias de exposição (Tabelas XII, XIV, XVI e XVIII). Os resultados da mortalidade cumulativa corrigida, pela fórmula de Abbott, foram corrigidos em relação ao valor do controlo negativo água (Tabelas XIII, XV, XVII e XIX).

3.1. Mortalidade de J2 de *Meloidogyne arenaria*

O maior número de J2 de *M. arenaria* mortos, por intervalo de tempo, verificou-se no exsudato de *S. nigrum* ao quarto dia (9,3%). A mortalidade mais elevada no controlo positivo foi de 8,0%, após 4 dias, e no controlo negativo só foi observada mortalidade no 1º e 4º dias, com valores de 1,4% e 1,3%, respectivamente (Tabela XII). Foram detectadas diferenças significativas ($F = 5,369$; $gl = 2$; $P < 0,05$) entre o exsudato radicular de *S. nigrum*, o de *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e a água (controlo negativo).

Tabela XII - Efeito dos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum*, *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo), na mortalidade de J2 de *Meloidogyne arenaria* após 3h, 6h e até 8 dias de exposição aos exsudatos e valor σ (desvio padrão).

Exsudatos radiculares	Mortalidade (%)									
	3h	6h	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>S. nigrum</i>	0,0 ±0,0	2,8 ±3,8	0,0 ±0,0	2,8 ±3,8	7,1 ±7,2	9,3 ±10,1	5,6 ±7,7	0,0 ±0,0	5,7 ±7,9	8,7 ±13,5
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	0,0 ±0,0	1,3 ±3,0	1,3 ±3,0	1,3 ±3,0	6,9 ±5,1	8,0 ±11,9	4,5 ±6,5	1,4 ±3,2	1,4 ±3,2	4,5 ±6,5
Água	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	1,4 ±3,2	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	1,3 ±3,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0

Na Figura XVIII verificamos que foi no exsudato radicular de *S. nigrum* que se observou maior % de mortalidade cumulativa, ao longo de todo o ensaio.

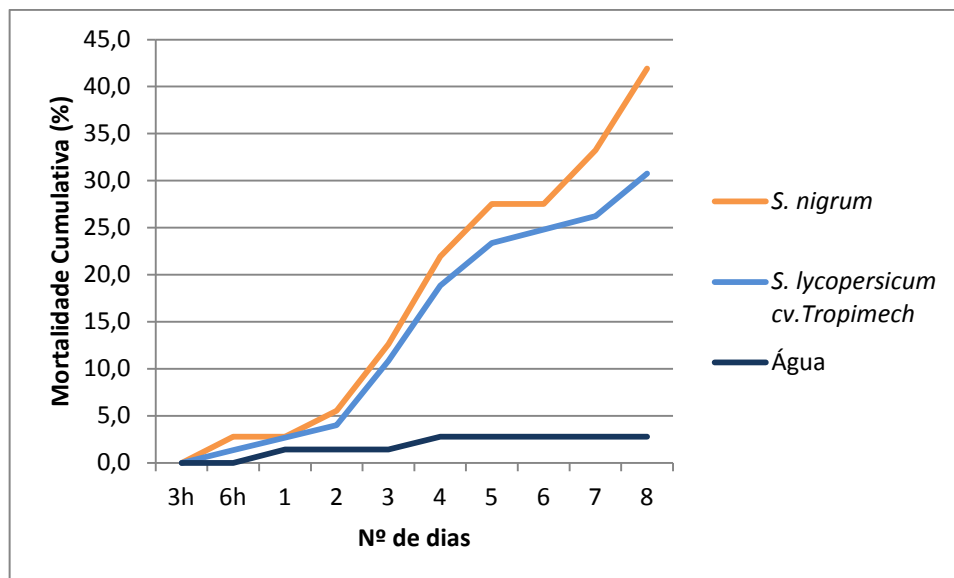


Figura XVIII - Evolução da mortalidade cumulativa de J2 de *Meloidogyne arenaria*, ao longo de 3h, 6h e até 8 dias de exposição aos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum*, *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo).

Considerando os valores de % MCC, em *S. nigrum* observou-se um valor de 40,3% enquanto em *S. lycopersicum* cv. Tropimech a mortalidade cumulativa corrigida foi de apenas 28,8% (Tabela XIII).

Tabela XIII – Mortalidade cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (%MCC) de J2 de *Meloidogyne arenaria* para os exsudatos radiculares de *Solanum nigrum* e *S. lycopersicum* cv. Tropimech.

Exsudatos radiculares	%MCC
<i>S. nigrum</i>	40,3
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	28,8

3.2. Mortalidade de J2 de *Meloidogyne chitwoodi*

Nos ensaios de mortalidade de *M. chitwoodi*, verificou-se que o maior número de J2 mortos, por intervalo de observações, foi em *S. nigrum* ao quarto dia (3,9%). A mortalidade máxima no controlo positivo (*S. lycopersicum* cv. Tropimech) foi de 2,7%, após 3h, aos 3 dias e aos 6 dias e no controlo negativo (água) só no 4º dia se verificou mortalidade e de apenas 1,3% (Tabela XIV). Não foram detectadas diferenças significativas ($F = 2,382$; $gl = 2$; $P > 0,05$) entre o exsudato radicular de *S. nigrum*, o de *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e a água (controlo negativo).

Tabela XIV - Efeito dos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum*, *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo), na mortalidade de J2 de *Meloidogyne chitwoodi* após 3h, 6h e até 8 dias de exposição aos exsudatos e valor σ (desvio padrão).

Exsudatos radiculares	Mortalidade (%)									
	3h	6h	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>S. nigrum</i>	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	1,4 ±3,2	2,8 ±3,8	3,9 ±5,9	1,4 ±3,2	2,8 ±3,8	0,0 ±0,0	1,3 ±0
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	2,7 ±6,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	2,7 ±3,7	1,3 ±3,0	0,0 ±0,0	2,7 ±3,7	0,0 ±0,0	1,3 ±3,0
Água	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	1,3 ±3,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0

Na Figura XIX observamos que até ao 3º dia de exposição foi nos exsudatos de *S. lycopersicum* cv. Tropimech que se verificou a maior mortalidade cumulativa, mas do 3º até ao 8º dias foi em *S. nigrum* que houve maior % de mortalidade cumulativa.

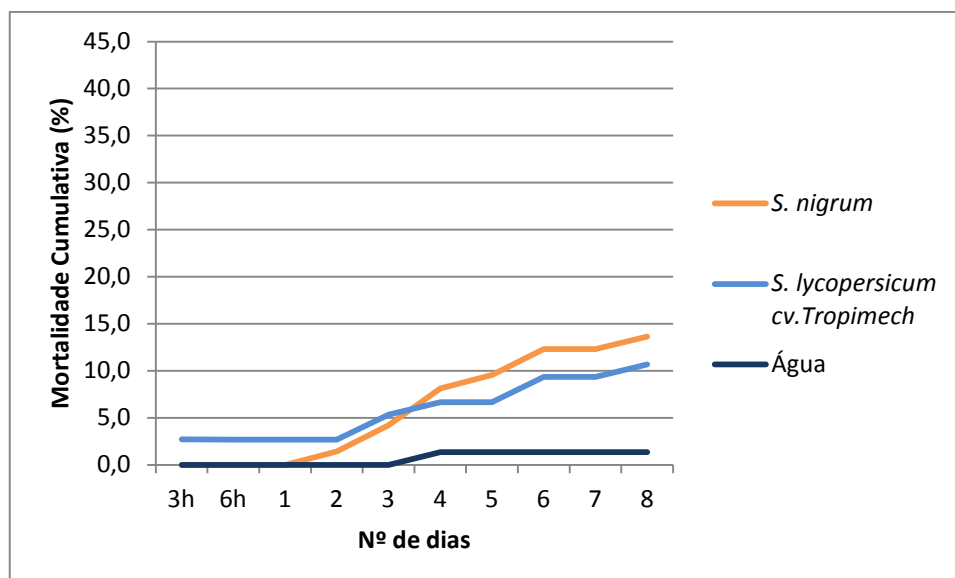


Figura XIX - Evolução da mortalidade cumulativa de J2 de *Meloidogyne chitwoodi*, ao longo de 3h, 6h e até 8 dias de exposição aos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum*, *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo).

Considerando os valores da %MCC, foi no exsudato radicular de *S. nigrum* que se observou maior percentagem de J2 mortos (12,5%), valor que baixou para 9,5% em *S. lycopersicum* cv. Tropimech (Tabela XV).

Tabela XV - Mortalidade cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (%MCC) de J2 de *Meloidogyne chitwoodi* para os exsudatos radiculares de *Solanum nigrum* e *S. lycopersicum* cv. Tropimech.

Exsudatos radiculares	%MCC
<i>S. nigrum</i>	12,5
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	9,5

3.3. Mortalidade de J2 de *Meloidogyne ethiopica*

Relativamente a *M. ethiopica*, o maior número de J2 mortos, por intervalo de tempo, verificou-se no exsudato de *S. nigrum* ao 4º dia (10,2%). Quanto ao controlo positivo só foi observada mortalidade ao 1º, 3º e 4º dias, com valores de 3,5%, 1,1% e 2,4%, respectivamente. No controlo negativo a mortalidade máxima foi observada ao 8º dia (8,6%) (Tabela XVI). Foram detectadas diferenças significativas ($F = 4,597$; $gl = 2$; $P < 0,05$) entre o exsudato radicular de *S. nigrum*, o de *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e a água (controlo negativo).

Tabela XVI - Efeito dos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum*, *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo), na mortalidade de J2 de *Meloidogyne ethiopica* após 3h, 6h e até 8 dias de exposição aos exsudatos e valor σ (desvio padrão).

Exsudatos radiculares	Mortalidade (%)									
	3h	6h	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>S. nigrum</i>	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	7,5 ±5,9	1,4 ±3,2	4,3 ±6,4	10,2 ±8,1	1,4 ±3,2	0,0 ±0,0	1,4 ±3,2	2,9 ±6,4
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	3,5 ±3,2	0,0 ±0,0	1,1 ±2,5	2,4 ±3,4	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0
Água	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	4,1 ±3,8	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	1,4 ±3,2	2,7 ±3,7	8,6 ±5,6

Na Figura XX pode observar-se que a maior % de mortalidade foi verificada sempre em *S. nigrum*, desde o início do ensaio até ao último dia, tal como aconteceu com *M. arenaria* e *M. javanica*.

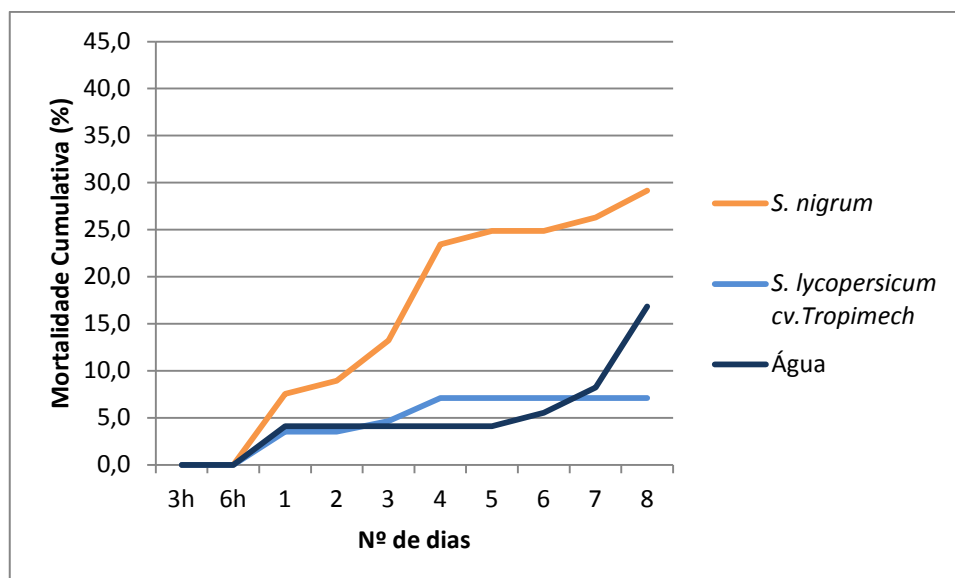


Figura XX - Evolução da mortalidade cumulativa de J2 de *Meloidogyne ethiopica*, ao longo de 3h, 6h e até 8 dias de exposição aos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum*, *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controle positivo) e água (controle negativo).

Nos testes de mortalidade de *M. ethiopica* verificou-se uma mortalidade cumulativa corrigida de -11,7% no exsudato de *S. lycopersicum* cv. Tropimech, indicando que a percentagem de mortalidade de J2 na água (valor relativo ao qual a mortalidade dos exsudatos em estudo foi corrigida) foi superior à mortalidade verificada no controlo positivo. A mortalidade cumulativa corrigida de J2 para o exsudato radicular de *S. nigrum* foi de 14,8% (Tabela XVII).

Tabela XVII - Mortalidade cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (%MCC) de J2 de *Meloidogyne javanica* para os exsudatos radiculares de *Solanum nigrum* e *S. lycopersicum* cv. Tropimech.

Exsudatos radiculares	%MCC
<i>S. nigrum</i>	14,8
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	-11,7

3.4. Mortalidade de J2 de *Meloidogyne javanica*

O maior número de J2 mortos, por intervalo de tempo, foi observado nos exsudatos de *S. nigrum* ao quarto dia (4,3%). No controlo positivo só foi verificada mortalidade ao 3º e 5º dias com valores de 1,3% e 3,0%, respectivamente. No controlo negativo apenas foi observada no 5º dia (2,2%) (Tabela XVIII). Não foram detectadas diferenças significativas ($F=2,447$; $gl = 2$; $P>0,05$) entre o exsudato radicular de *S. nigrum*, o de *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e a água (controlo negativo).

Tabela XVIII - Efeito dos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum*, *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo), na mortalidade de J2 de *Meloidogyne javanica* após 3h, 6h e até 8 dias de exposição aos exsudatos e valor σ (desvio padrão).

Exsudatos radiculares	Mortalidade (%)									
	3h	6h	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>S. nigrum</i>	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	2,6 ±4,4	0,0 ±0,0	4,3 ±3,7	0,0 ±0,0	2,8 ±4,8	2,4 ±4,1	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	1,3 ±2,3	0,0 ±0,0	3,0 ±5,2	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0
Água	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	2,2 ±3,8	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0

Na Figura XXI observamos que nos exsudatos radiculares de *S. nigrum* houve maior % de mortalidade cumulativa desde o início do ensaio até ao último dia, tal como observado com *M. arenaria*.

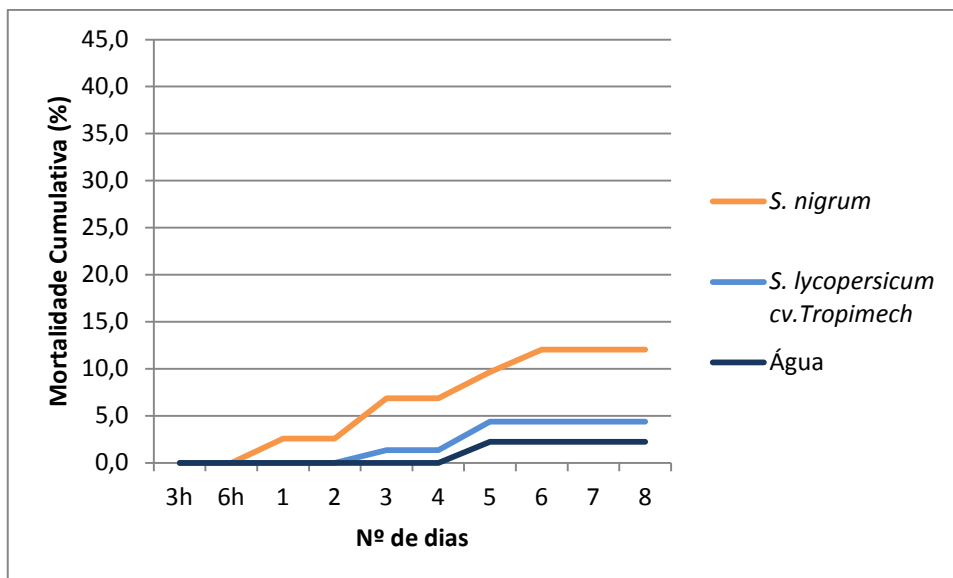


Figura XXI - Evolução da mortalidade cumulativa de J2 de *Meloidogyne javanica*, ao longo de 3h, 6h e até 8 dias de exposição aos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum*, *S. lycopersicum* cv. Tropimech (controlo positivo) e água (controlo negativo).

A mortalidade cumulativa corrigida para *S. nigrum* foi de 10,0% e para *S. lycopersicum* cv. Tropimech de 2,2% (Tabela XIX).

Tabela XIX - Mortalidade cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (%MCC) de J2 de *Meloidogyne javanica* para os exsudatos radiculares de *Solanum nigrum* e *S. lycopersicum* cv. Tropimech.

Exsudatos radiculares	%MCC
<i>S. nigrum</i>	10,0
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	2,2

4. RESISTÊNCIA/SUSCEPTIBILIDADE DE *SOLANUM NIGRUM* A *MELOIDOGYNE* SPP.

Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas XX a XXIII.

Em todos os ensaios, tanto nas plantas de *S. nigrum* como na testemunha, foram visíveis na parte aérea, amarelecimento das folhas e, na parte radicular, a formação de galhas (Figuras XXII e XXIII).



Figura XXII – Plantas de tomateiro *Solanum lycopersicum* cv. Easypeel (à esquerda) e de *S. nigrum* (à direita), infectadas com *Meloidogyne chitwoodi*.



Figura XXIII – Raiz de tomateiro *Solanum lycopersicum* cv. Tropimech infectada com *Meloidogyne* spp., onde são visíveis as galhas e as massas de ovos.

4.1. Reacção de *Solanum nigrum* a *Meloidogyne ethiopica*

Para os testes de patogenicidade de *Meloidogyne ethiopica* foram inoculadas 7 plantas de *Solanum nigrum* e outras 7 do controlo, *S. lycopersicum* cv. Easypeel. Em todas as plantas estudadas foram observadas >100 galhas e >100 massas de ovos, que representam um IG e um IMO de valor 5. O valor de densidade populacional final (P_f) para *S. nigrum* foi em média de 81390,5 ovos, sendo menor em *S. lycopersicum* cv. Easypeel (58285,7 ovos). Quanto aos

valores do factor de reprodução (FR), em *S. nigrum* foi em média de 16,3 e em *S. lycopersicum* cv. Easypeel de 11,7 (Tabela XX).

Tabela XX - Índice de galhas (IG), índice de massas de ovos (IMO), densidade populacional final (Pf) $\pm \sigma$ (desvio padrão) e factor de reprodução (FR) $\pm \sigma$ (desvio padrão) em *Solanum nigrum* e *S. lycopersicum* cv. Easypeel, inoculadas com 5000 ovos e J2 de *Meloidogyne ethiopica*.

Espécie	IG	IMO	P _f	FR
<i>Solanum nigrum</i>	5	5	81390,5 \pm 47262,1	16,3 \pm 9,5
<i>S. lycopersicum</i> cv. Easypeel	5	5	58285,7 \pm 22467,1	11,7 \pm 4,5

A espécie *S. nigrum* foi considerada susceptível em relação ao isolado de *M. ethiopica* (Tabela XXI).

Tabela XXI - Avaliação do grau de Resistência/Susceptibilidade (GR), tendo em conta os estragos na planta hospedeira (IG) e a eficiência da planta hospedeira (FR), de *Solanum nigrum* e *S. lycopersicum* cv. Easypeel, inoculadas com 5000 ovos e J2 de *Meloidogyne ethiopica*.

Espécie	Estragos na planta hospedeira (IG)	Eficiência da planta hospedeira (FR)	Grau de Resistência/Susceptibilidade (GR)
<i>Solanum nigrum</i>	>2	>1	Susceptível
<i>S. lycopersicum</i> cv. Easypeel	>2	>1	Susceptível

4.2. Reacção de *Solanum nigrum* a *Meloidogyne javanica*

Para os testes de patogenicidade de *Meloidogyne javanica*, foram inoculadas 5 plantas de *Solanum nigrum* e 5 plantas de *S. lycopersicum* cv. Tropimech, que serviram como controlo. Das 5 plantas usadas para cada cultivar em estudo, morreram duas de *S. nigrum* e 3 de *S. lycopersicum* cv. Tropimech, tendo ficado o estudo reduzido a 3 plantas de *S. nigrum* e duas de *S. lycopersicum* cv. Tropimech. Em todas as plantas estudadas, foram observadas >100 galhas e >100 massas de ovos, que representam valores de IG e IMO de 5. O valor de densidade populacional final (P_f) foi para *S. nigrum* de 62700 ovos e J2, sendo superior em *S. lycopersicum* cv. Tropimech (123150 ovos e J2). Quanto aos valores do factor de reprodução (FR), em *S. nigrum* foi de 12,5 e em *S. lycopersicum* cv. Tropimech de 24,6, (Tabela XXII).

Tabela XXII - Índice de galhas (IG), índice de massas de ovos (IMO), densidade populacional final (P_f) $\pm \sigma$ (desvio padrão) e factor de reprodução (FR) $\pm \sigma$ (desvio padrão) em *Solanum nigrum* e *S. lycopersicum* cv. Tropimech, inoculadas com 5000 ovos e J2 de *Meloidogyne javanica*.

Espécie	IG	IMO	P_f	FR
<i>Solanum nigrum</i>	5	5	62700 \pm 30445,2	12,5 \pm 6,1
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	5	5	123150 \pm 1484,9	24,6 \pm 0,3

A espécie *S. nigrum* foi considerada susceptível ao isolado de *M. javanica* (Tabela XXIII).

Tabela XXIII - Avaliação do grau de Resistência/Susceptibilidade (GR), tendo em conta os estragos na planta hospedeira (IG) e a eficiência da planta hospedeira (FR), de *Solanum nigrum* e *S. lycopersicum* cv. Tropimech, inoculadas com 5000 ovos e J2 de *Meloidogyne javanica*.

Espécie	Estragos na planta hospedeira (IG)	Eficiência da planta hospedeira (FR)	Grau de Resistência/Susceptibilidade (GR)
<i>Solanum nigrum</i>	>2	>1	Susceptível
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	>2	>1	Susceptível

VI DISCUSSÃO

1. EFEITOS DOS EXSUDATOS RADICULARES DE *SOLANUM NIGRUM* NA ECLOSÃO DE JOVENS DO SEGUNDO ESTÁDIO DE *MELOIDOGYNE* SPP.

Algumas plantas têm na sua constituição substâncias químicas com efeito nematocida, que podem estar nas diferentes partes da planta, tais como folhas, frutos e raízes (Dias-Arieira *et al.*, 2003). Os exsudatos de todas as plantas da família Solanaceae, nomeadamente *Solanum nigrum*, apresentam propriedades nematocidas (Haseeb & Butool, 1996). Estas propriedades podem revelar-se através de efeitos sobre a eclosão dos J2, mortalidade dos J2 ou reação das plantas depois de infectadas.

Nas 4 espécies de *Meloidogyne* testadas, verificou-se que houve maior percentagem de eclosões no controlo negativo (água), excepto em *M. javanica* que teve maior eclosão no controlo positivo (*S. lycopersicum* cv. Tropimech). Para as quatro espécies em estudo verificou-se menor eclosão nos exsudatos radiculares de *S. nigrum*, em comparação com os controlos negativo e positivo (Tabela XXIV).

Tabela XXIV - Eclosão dos J2 de *M. chitwoodi*, *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. ethiopica*, nos exsudatos radiculares de *Solanum nigrum* e *S. lycopersicum* cv.Tropimech e na água.

% Eclosão				
	<i>M. chitwoodi</i>	<i>M. arenaria</i>	<i>M. javanica</i>	<i>M. ethiopica</i>
<i>Solanum nigrum</i>	67,3	68,1	70,4	92,4
<i>S. lycopersicum</i> cv.Tropimech	71,5	82,9	93,2	97,3
Água	87,4	92,3	87,8	98,8

Nos estudos da eclosão, a maioria das espécies estudadas registou maior eclosão nos exsudatos de *S. nigrum* nos três primeiros dias, excepto *M. chitwoodi* em que foi entre o 10º e 12º dias de exposição ao exsudato que se observou maior percentagem de J2 eclodidos (Tabelas IV, VI, VIII e X).

Fazendo a comparação dos valores de %IEC obtidos para as quatro espécies de *Meloidogyne* em estudo, verificou-se que os exsudatos radiculares de *S. nigrum* tiveram algum efeito na inibição da sua eclosão. Estes exsudatos poderão ter na sua constituição substâncias com efeito inibidor da eclosão, ainda que esta influência seja bastante reduzida tendo em conta que foi em *M. arenaria* que se observou maior percentagem de IECC mas, apenas com um valor de 26,2%. Este resultado está de acordo com a avaliação realizada por Haseeb & Butool, em 1996, em que estudaram a eclosão dos J2 de *M. incognita*. No seu estudo todas as plantas da família Solanaceae, de entre as quais *S. nigrum*, inibiram a eclosão dos J2. Estes autores expuseram 1 massa de ovos de *M. incognita* durante 5 dias ao exsudato radicular de *S. nigrum*, tendo eclodido 17 J2. No nosso estudo o efeito do exsudato radicular de *S. nigrum* apresentou, em quase todas as espécies estudadas, um efeito pouco inibidor não tendo mesmo, qualquer efeito em *M. ethiopica* (Tabela XXV). Estes resultados vão ao encontro dos apresentados por Dias *et al.* (2012), com exsudatos de quatro cultivares de *S. sisymbriifolium*, em que os exsudatos apresentaram apenas um ligeiro efeito sobre a eclosão de J2 de *Meloidogyne* spp. em estudo, variando de sem efeito a pouco inibidor, tal como nos resultados agora obtidos.

Tabela XXV - Inibição da eclosão cumulativa corrigida (pela fórmula de Abbott) dos J2 de *M. chitwoodi*, *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. ethiopica*, em exsudatos radiculares de *Solanum nigrum* e *S. lycopersicum* cv. Tropimech, e classificação do efeito destes exsudatos radiculares.

% IECC e Efeito do Exsudato radicular								
	<i>M. chitwoodi</i>		<i>M. arenaria</i>		<i>M. javanica</i>		<i>M. ethiopica</i>	
	% IECC	Efeito do exsudato radicular	% IECC	Efeito do exsudato radicular	% IECC	Efeito do exsudato radicular	% IECC	Efeito do exsudato radicular
S. nigrum	23,0	(+) Pouco Inibidor	26,2	(+) Pouco Inibidor	19,8	(+) Pouco Inibidor	6,5	(0) Sem Efeito
S. lycopersicum cv. Tropimech	18,3	(+) Pouco Inibidor	10,2	(0) Sem Efeito	-6,1	(0) Sem Efeito	1,4	(0) Sem Efeito

2. EFEITOS DOS EXSUDATOS RADICULARES DE *SOLANUM NIGRUM* NA MORTALIDADE DE JOVENS DO SEGUNDO ESTÁDIO DE *MELOIDOGYNE* SPP.

Comparando os resultados obtidos com as 4 espécies de *Meloidogyne* testadas relativamente à mortalidade dos J2, verificou-se que houve maior percentagem de mortalidade cumulativa corrigida nos exsudatos de *Solanum nigrum* em comparação com o controlo positivo (*S. lycopersicum* cv. Tropimech). Comparando os resultados obtidos nos dois controlos, verificou-se que, em todas as espécies de *Meloidogyne*, no exsudato de *S. lycopersicum* cv. Tropimech os valores de %MCC foram superiores aos obtidos para a água, excepto em *M. ethiopica* em que se verificou exactamente o contrário. De todas as espécies de *Meloidogyne* em estudo foi em *M. arenaria* que a mortalidade foi superior, nos dois exsudatos testados (Tabela XXVI).

Tabela XXVI - Mortalidade cumulativa corrigida (pela fórmula de Abbott) dos J2 de *M. chitwoodi*, *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. ethiopica*, em exsudatos radiculares de *Solanum nigrum* e *S. lycopersicum* cv. Tropimech.

Mortalidade Cumulativa Corrigida (%)				
	<i>M. chitwoodi</i>	<i>M. arenaria</i>	<i>M. javanica</i>	<i>M. ethiopica</i>
<i>Solanum nigrum</i>	12,5	40,3	10	14,8
<i>S. lycopersicum</i> cv. Tropimech	9,5	28,8	2,2	-11,7

Analisando os valores de %MCC obtidos, verifica-se que os exsudatos radiculares de *S. nigrum* apresentam algum efeito na mortalidade dos J2 das espécies de *Meloidogyne* estudadas, indicando a possibilidade de estes exsudatos terem presentes substâncias com efeito nematocida, ainda que o efeito seja reduzido na maioria das espécies. Tendo em conta que Haseeb & Butool, em 1996, avaliaram o efeito na mortalidade de algumas plantas da família Solanaceae, incluindo esta, e verificaram que após 1, 2, 3 e 4 dias de exposição dos J2 ao exsudato radicular havia efeito na sua mortalidade, seria de esperar que *S. nigrum* apresentasse algum efeito. O estudo destes autores indicou que após um dia de exposição aos exsudatos radiculares de *S. nigrum* a mortalidade foi de 80%, após 2 dias de 72%, após 3 dias de 78% e no 4º dia de 87%. Os efeitos de *S. nigrum*, bem como os da espécie *S. sisymbriifolium*, também foram estudados por Pestana *et al.* (2009), em relação ao nemátode-das-lesões radiculares, *Pratylenchus goodeyi*. O estudo mostrou que ambas as plantas têm efeito na mortalidade de *P. goodeyi* e que têm substâncias com propriedades nematocidas ou nematostáticas.

3. RESISTÊNCIA/SUSCEPTIBILIDADE DE *SOLANUM NIGRUM* A *MELOIDOGYNE* SPP.

As populações de *M. javanica* têm capacidade de sobreviver em plantas não cultivadas pertencentes à família das Solanaceas, como é o caso de *Solanum nigrum* (Eddaoudi *et al.*, 1997).

A avaliação da reprodução dos isolados de *M. javanica* e *M. ethiopica* em *S. nigrum* foi feita tendo em conta o número de galhas e massas de ovos que as plantas apresentavam 60 dias após a inoculação com 5000 ovos e J2 das espécies em causa, bem como a população final (Pf), o que permitiu calcular o factor de reprodução (FR). Em todas as plantas usadas no ensaio o valor de índice de galhas (IG) foi >2 e o factor de reprodução (FR) >1, mostrando que *S. nigrum* é susceptível aos isolados estudados (*M. javanica* e *M. ethiopica*). *Solanum lycopersicum* cv. Tropimech inoculado com *M. javanica* e *Solanum lycopersicum* cv. Easypeel inoculado com *M. ethiopica*, também foram susceptíveis, como já era esperado, pois foram por isso escolhidos para os controlos positivos (Tabela XXVII).

Tabela XXVII - Índice de galhas (IG), índice de massas de ovos (IMO), factor de reprodução (FR) e avaliação do grau de Resistência/Susceptibilidade (GR), tendo em conta os estragos na planta hospedeira (IG) e a eficiência da planta hospedeira (FR), em *Solanum nigrum* e *S. lycopersicum* cv. Easypeel a *Meloidogyne ethiopica* e de *Solanum nigrum* e *S. lycopersicum* cv. Tropimech a *Meloidogyne javanica*, em plantas inoculadas com 5000 ovos e J2.

<i>M. ethiopica</i>						
	IG	IMO	FR	Estragos na planta hospedeira (IG)	Eficiência da planta hospedeira (FR)	Grau de Resistência/susceptibilidade (GR)
<i>S. nigrum</i>	5	5	16,3	>2	>1	S
<i>S. lycopersicum</i> cv. <i>Easypeel</i>	5	5	11,7	>2	>1	S
<i>M. javanica</i>						
	IG	IMO	FR	Estragos na planta hospedeira (IG)	Eficiência da planta hospedeira (FR)	Grau de Resistência/susceptibilidade (GR)
<i>S. nigrum</i>	5	5	12,5	>2	>1	S
<i>S. lycopersicum</i> cv. <i>Tropimech</i>	5	5	24,6	>2	>1	S

Estes resultados confirmam os obtidos por Lima *et al.* (2009), num estudo onde foram encontradas plantas de *S. nigrum* parasitadas por *Meloidogyne*, nomeadamente *M. ethiopica*, uma espécie agressiva para a cultura da batateira e considerada de quarentena. Estes

resultados vão ainda ao encontro dos publicados por Ardakani & Mirinejad (2013), que ao estudarem varias infestantes inoculadas com *M. incognita*, verificaram que *S. nigrum* era muito susceptível. Também Dias *et al.* (2012), testou 4 cvs de *S. sisymbriifolium* quanto à reacção a *Meloidogyne*, relatando que todas as cvs de *S. sisymbriifolium* se mostraram hipersusceptíveis a *M. arenaria* e *M. hapla* embora resistentes a *M. chitwoodi*. Quanto a *M. hispanica* todas as cultivares se mostraram resistentes excepto a cv. Pion, que foi susceptível. Quanto a *M. javanica* as cvs Sharp e Pion foram susceptíveis, a cv. Domino resistente e a cv. Sis 4004 hipersusceptível. As diferenças entre os resultados de Dias *et al.* (2012) e os do presente estudo podem ser devidas à diferença de espécie de *Solanum* em estudo. Porém Dias *et al.* (2012) aponta as variações das condições ambientais e de laboratório, como possíveis responsáveis pelas diferenças entre os resultados obtidos no seu trabalho. Os resultados são diferentes dos obtidos por Pestana & Abrantes (2008), que estudaram os efeitos das plantas *S. nigrum* e *S. sisymbriifolium*, inoculadas com *Pratylenchus goodeyi*. Foram verificados baixos valores de FR, indicando que as duas espécies de *Solanum* não são susceptíveis a *P. goodeyi*. Neste caso a diferença de resultados pode estar associada, para além da espécie de nemátodes ser diferente, ao substrato utilizado, que foi diferente do usado nos ensaios agora realizados, e a outras condições de realização do ensaio. Nos ensaios de Pestana & Abrantes (2008), foi utilizado substrato esterilizado composto por turfa, areão e aparas de madeira decompostas e o inóculo foi inferior ao usado agora, pois tinham sido inoculados apenas 4 000 jovens por vaso.

Embora tendo sido realizados dois ensaios para *M. chitwoodi*, não foi possível obter resultados sobre a sua patogenicidade. No primeiro ensaio todas as plantas inoculadas, morreram. No segundo ensaio não se conseguiu obter inóculo suficiente para a sua realização. O ensaio com *M. arenaria* também falhou pois todas as plantas inoculadas acabaram por morrer um mês após terem sido inoculadas, período insuficiente para os nemátodes completarem o seu ciclo de vida. O facto de todas estas plantas terem morrido, pode estar associado a grandes ataques por mosca branca e fungos, na estufa onde decorreram os ensaios. No período em que decorreram os ensaios de *M. javanica* e *M. arenaria* também se verificou uma avaria com o ar condicionado e realizou-se uma desinfecção com enxofre que pode ter provocado a morte de todas as plantas inoculadas com *M. arenaria* e a morte de algumas plantas inoculadas com *M. javanica*, devido à sua fitotoxicidade.

VII CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos nos ensaios realizados, poderão tirar-se algumas conclusões sobre a eclosão observada.

Com as várias espécies de *Meloidogyne* estudadas verificou-se que os exsudatos radiculares de *S. nigrum* foram os mais eficientes na inibição de eclosão, podendo concluir-se que a *S. nigrum* apresenta alguma, ainda que reduzida, eficácia na inibição da eclosão dos jovens de *Meloidogyne*. A utilização de plantas que apresentem nos seus exsudatos propriedades inibidoras da eclosão dos J2, pode revelar-se como uma boa estratégia de utilização de antagonistas naturais.

Em relação aos testes de mortalidade, verificou-se que os exsudatos radiculares de *S. nigrum* foram mais eficientes na mortalidade dos J2 das espécies em estudo, concluindo-se que esta planta poderá causar alguma mortalidade dos J2 no campo, contribuindo, por esta via, para diminuir a densidade populacional. No entanto, a percentagem de mortalidade não foi muito elevada e mais testes deverão ser realizados.

Relativamente à resistência das plantas de *S. nigrum* a *M. ethiopica* e a *M. javanica*, ambas foram consideradas susceptíveis. Assim, sendo *S. nigrum* susceptível aos dois isolados poderá ser utilizada como planta armadilha. Quando colocada no campo intercalada com a cultura principal e se destruída a tempo, pode diminuir consideravelmente a densidade populacional destes nemátodes no campo. Deste modo a cultura principal poderá ter uma maior produção sem ter de recorrer a produtos químicos.

Estas plantas têm a capacidade de manter as populações de NGR baixas e desta forma manter os níveis de prejuízos causados por estas espécies economicamente toleráveis, limitando assim a necessidade de utilização de produtos fitofarmacêuticos e aumentando a produção e a qualidade das culturas.

Os resultados obtidos podem ajudar no desenvolvimento de novos produtos com efeitos nematodocidas de origem vegetal, a partir da espécie *S. nigrum* para o controlo dos NGR.

Num estudo futuro seria proveitoso realizar estes testes com exsudatos de parte aérea, tendo em conta que alguns estudos já realizados mostraram que os exsudatos aquosos da parte aérea das Solanaceas apresentaram maior toxicidade do que os exsudatos radiculares.

VIII BIBLIOGRAFIA

ABAD, Pierre, GOUZY, Jérôme, AURYC, Jean-Mar, CASTAGNONE-SERENO, Philippe, DANCHIN, Etienne G J, DELEURY, Emeline, PERFUS-BARBEOCH, Laetitia, ANTHOUARD, Véronique, ARTIGUENAVE, François, BLOK, Vivian C, CAILLAUD, Marie-Cécile, COUTINHO, Pedro M, DASILVA, Corinne, LUCA, Francesca De, DEAU, Florence, ESQUIBET, Magali, FLUTRE, Timothé, GOLDSTONE, Jared, HAMAMOUCHE, Nouredine, HEWEZI, Tarek, JAILLON, Olivier, JUBIN, Claire, LEONETTI, Paola, MAGLIANO, Marc, MAIER, Tom R, MARKOV, Gabriel V, VEIGH, Paul Mc, PESOLE, Graziano, POULAI, Julie N, ROBINSON-RECHAVI, Marc, SALLET, Erika, SÉGURENS, Béatrice, STEINBACH, Delphine, TYTGAT, Tom, UGARTE, Edgardo, GHELDER Cyril van, VERONICO, Pasqua, BAUM, Thomas J, BLAXTER, Mark, BLEVE-ZACHEO, Teresa, DAVIS, Eric L, EWBANK, Jonathan J, FAVERY, Bruno, GRENIER, Eric, HENRISSAT, Bernard, JONES, John T, LAUDE, Vincent, MAULE, Aaron G, QUESNEVILLE, Hadi, ROSSO, Marie-Noélie, SCHIEX, Thomas, SMANT, Geert, WEISSENBACH, Jean, & WINCKER, Patrick (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* 26, 909 – 915.

ABBOTT, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18, 265-266.

ABRANTES, I. M. de O., SANTOS, M. C. V., CONCEIÇÃO, I. L. P. M., CUNHA, M. J. & SANTOS, S. N. de A. (2004). Biochemical and molecular characterization of plant-parasitic nematodes. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 232 – 258.

ABRANTES, I. M. de O., SANTOS, M. C. V., SANTOS, M. S. N. A., FRANCO, C. M. A., CLARA, M. I. E., VINAGRE, L. R. R. G., FERNANDES, J. M. E., NETO, E. M. R., RAMOS, N. G. P. S., SOUSA, J. M. B., LOPES, M. N. P., MOURO, F. P. M., SOBRAL, N. M. M., MARQUES, M. L., HEITOR, J. W. M., LOURO, D. & PINTO, A. A. P. M.. (2007) Principais doenças e pragas do tomateiro e meios de luta. Coimbra: Instituto do Ambiente e Vida, Departamento de Zoologia, Universidade de Coimbra.

AHMAD, Faheem, RATHER, Mohmad Azhar, SIDDIQUI & Mansoor Ahmad (2002). Nematicidal activity of leaf extracts from *Lantana camara* L. against *Meloidogyne*

incognita (kofoid and white) chitwood and its use to manage roots infection of *Solanum melongena* L. Section of Plant Pathology and Plant Nematology; Department of Botany; Aligarh Muslim University. 53 (3), 543-548.

ANWAR, Ali, ZIA, Amjad & JAVED, Nazir (2009). *Meloidogyne incognita* Infection of Five Weed Genotypes *Safdar. Pakistan journal of zoology*. 41 (2), 95-100.

ARDAKANI, Abbas Salahi & MIRINEJAD, Shahabaldin (2013). Susceptibility of weeds and vegetable crops of Iran to *Meloidogyne incognita*. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 5 (12), 1324-1327.

BITHELL, S. L., MCKENZIE, B. A., BOURDÔT, G. W., HILL, G. D. & WRATTEN, S. D. (2002). Germination requirements of laboratory stored seeds of *Solanum nigrum* and *Solanum physalifolium*. *New Zealand Plant Protection* 55, 222-227.

CAILLAUD, Marie-Cécile, DUBREUIL, G eraldine, QUENTIN, Mich ael, PERFUS-BARBEOCH, Laetitia, LECOMTE, Philippe, ENGLER, Janice de Almeida, ABAD, Pierre, ROSSO, Marie-Noelle & FAVERY, Bruno (2007). Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology* 165, 104-113.

COLLANGE, B atrice, NAVARRETE, Mireille, PEYRE, Ga elle, MATEILLE, Thierry & TCHAMITCHIAN, Marc (2011). Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis. *Crop Protection* 30, 1251-1262.

CONCEIÇAO, Isabel Luci, DIAS, Ana Margarida Caetano, ABRANTES, Isabel & CUNHA, Maria José Moreno (2012). Efeito dos exsudatos radiculares de *Solanum sisymbriifolium* na eclosão de *Meloidogyne* spp, *Revista da Ciências Agr rias* 29, 274-281.

COYNE, D. L., NICOL, J. M. & CLAUDIUS-COLE, B. (2007). Practical plant nematology: a field and laboratory guide. SPIPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin, 84 pp.

DABIR , Kounbobr R., CHOTTE, Jean-Luc, FOULD, Sabine & MATEILLE, Thierry (2005). Distribution of *Pasteuria penetrans* in size fractions of a *Meloidogyne javanica*-infested field soil. *Pedobiologia* 49, 335-343.

DIAS, Margarida Caetano, CONCEIÇÃO, Isabel Luci, ABRANTES, Isabel & CUNHA, Maria José (2012). *Solanum sisymbriifolium* - a new approach for the management of plant-parasitic nematodes. *European Journal Plant Pathology* 133, 171–179.

DING, Xia, ZHU, Fangshi & GAO, Siguo (2012). Purification, antitumour and immunomodulatory activity of water-extractable and alkali-extractable polysaccharides from *Solanum nigrum* L. *Food Chemistry* 131, 677–684.

DING, Xia, ZHU, Fangshi, YANG, Yun & LI, Ming (2013). Purification, antitumor activity in vitro of steroidal glycoalkaloids from black nightshade (*Solanum nigrum* L.). *Food Chemistry* 141, 1181–1186.

EDDAOUDI, Mohamed, AMMATI, Mohamed & RAMMAH, Abdallah (1997). Identification of the resistance breaking populations of *Meloidogyne* on tomatoes in Morocco and their effect on new sources of resistance. *Fundamental and Applied Nematology*, 20 (3), 285-289.

EDMONDS, Jennifer M. & CHWEYA, James A. (1995). Black nightshades - *Solanum nigrum* L. and related species. International Plant Genetic Resources Institute ISBN 92-9043-321-3.

EISENBACK, J. D., HIRSCHMANN, Hedwig & TRIANTAPHYLLOU, A. C. (1980). Morphological Comparison of *Meloidogyne* Female Head Structures, Perineal Patterns, and Stylets. *Journal Series of the North Carolina Agricultural* 1 Paper No. 6333. 300-313.

EISENBACK, J. D. & HUNT, D. J. (2009). General Morphology. In: *Root-knot-nematodes* (Eds. Perry, R. N., Moens, M. and Starr, J. L.), pp. 1-16. CAB International: Wallingford, U.K.

EL-SHENNAWY, M. Z., KHALIFA, E. Z., AMMAR, M. M., MOUSA, E. M. & HAFEZ, S. L. (2013). Biological control of the disease complex on potato caused by root-knot nematode and *fusarium* wilt fungus. *Nematologia. Mediterranea* 40, 169-172.

ESFAHANI, Mehdi Nasr (2009). Distribution and identification of root-knot nematode species in tomato fields. *Mycopathologia* 7, 45-49.

GHARABADIYAN, Fatemeh, JAMALI, Salar, YAZDI, Amir Ahmadiyan, HADIZADEH, Mohammad Hasan & ESKANDARI, Ali (2012). Weed hosts of root-knot nematodes in tomato fields. *Journal of Plant Protection Research* 52, 230-234.

GOULART, Alexandre (2010). Análise Nematológica: importância e princípios gerais. Documentos 299. Embrapa Cerrados. ISSN 1517-5111.

HASEEB, Akhtar & BUTOOL, Farzana (1996). Evaluation of Nematicidal Properties of Some Members of the Family *Solanaceae*. *Bioresource Technology* 57, 95-97.

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

KAMGARI, Nona (2009). Temperature requirement for germination of *Solanum nigrum* seeds. Department of Crop Production and Ecology, Swedish University of Agricultural Sciences. 1-18.

KHATTAK, Jabar, ANWAR, Zubair, AFTAB, Sumiya, AFZAL, Muhammad, ISLAM, Mazhar & KHAN, Anwar (2012). *Solanum nigrum* as Potent Therapy: A Review. *Journal of Pharmacology and Toxicology* 3 (4), 185-189.

KREMER, E. & LOTZ, L. A. P. (1998). Germination and emergence characteristics of triazine-susceptible and triazine-resistant biotypes of *Solanum nigrum*. *Journal of Applied Ecology* 35, 302-310.

MITKOWSKI, Nathaniel A. & ABAWI, George S.. (2003.). Root-Knot nematodes. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2003-0917-01 Revised 2011. <http://www.apsnet.org/EDCENTER/INTROPP/LESSONS/NEMATODES/Pages/RootknotNematode.aspx>

MOENS, M., PERRY, R. N. & STARR, J. L. (2009). *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: *Root-knot-nematodes* (Eds. Perry, R. N., Moens, M. and Starr, J. L.), pp. 1-16. CAB International: Wallingford, U.K.

MOLINARI, S. & BASER, N. (2010). Induction of resistance to root-knot nematodes by SAR elicitors in tomato. *Crop Protection* 29, 1354-1362.

MONTE, J. P & TARQUIS, A. M. (1997). The role of temperature in the seed germination of two species of the *Solanum nigrum* complex. *Journal of Experimental Botany* 48 (317), 2087-2093.

MOREIRA, Francisco José Carvalho, GONZAGA, Carmem Dolores Santos & INNECCO, Renato (2009). Eclosão e mortalidade de juvenis J2 de *Meloidogyne incognita* raça 2 em óleos essenciais.. *Revista Ciências Agronômicas* 40 (3), 441-448, www.ccarevista.ufc.br.

MUKHTAR, Tariq, HUSSAIN, Muhammad Arshad, KAYANI, Muhammad Zameer & ASLAM, Muhammad Naveed (2014). Evaluation of resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in okra cultivars. *Crop Protection* 56, 25-30.

NCHORE, S. B., WACEKE, J. W & KARIUK, G. M.. (2011). Use of agro-industrial waste and organic amendments in managing root knot nematodes in black nightshade in selected parts of Kenya . *African Crop Science Conference Proceedings* 10, 223 – 229. ISSN 1023-070X.

NIRMAL,S. A., PATEL, A. P., BHAWAR, S. B. & PATTAN, S. R. (2012). Antihistaminic and antiallergic actions of extracts of *Solanum nigrum* berries: Possible role in the treatment of asthma. *Journal of Ethnopharmacology* 142, 91–97.

OOSTENBRINK, M. (1966). Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen* 66, 1-46.

PAJOVIĆ, Igor, BIRD, Georg W., ŠIRCA, Saša, UREK, Gregor, RAJKOVIĆ, Dragana, BARSÍ, László & RADIVOJEVIĆ, Milan (2010). *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae) detected in greenhouses in Zeta-Bjelopavlići Valley. *Natura Montenegrina, Podgorica* 9 (3), 913-925.

PESTANA, M., GOUVEIA & M., ABRANTES, I. (2008). Efeitos de *Solanum sisymbriifolium* e *S. nigrum* sobre nemátodes-das-lesões-radiculares, *Pratylenchus goodeyi*, parasita da bananeira. *Revista de Ciências Agrárias*, 173-176.

PESTANA, M., RODRIGUES, M., TEIXEIRA, L., ABRANTES, I. M. de O., GOUVEIA, M. & CORDEIRO, N. (2009). Nematicidal activity of *Solanum sisymbriifolium* and *S. nigrum* extracts against the root-lesion nematode *Pratylenchus goodeyi*. Comunicação apresentada na

3ª Conferência Internacional de Meio Ambiente Industrial e Microbiologia Aplicada - BioMicroWorld em Lisboa, 81- 85.

RAWANIA, Anjali, GHOSHB, Anupam & CHANDRAA, Goutam (2003). Mosquito larvicidal and antimicrobial activity of synthesized nano-crystalline silver particles using leaves and green berry extract of *Solanum nigrum* L. (Solanaceae: Solanales). *Acta Tropica* 128, 613- 622.

ROBAB, Merajul Islam, SHAIKH, Hisamuddin & AZAM, Tanweer (2012). Antagonistic effect of *Glomus mosseae* on the pathogenicity of root-knot nematode infected *Solanum nigrum*. *Crop Protection* 42, 351-355.

SASSER, J. N., CARTER, C. C. & HARTMAN, K. M. (1984). Standardization of Host Suitability Studies and Reporting of Resistance to Root-Knot Nematodes. pp. 7. A cooperative publication of the Department of Plants Pathology. North Carolina University and the United States Agency for International Development. North Carolina University Graphics. U. S. A.

SHEPHERD, A. M. (1986). Extraction and estimation of cyst nematodes. In: *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes* (Ed. Southey, J. F.). Technical Bulletin N°2, Ministry of Agriculture Fisheries and Food, London, UK, H. M. S. O., pp. 31-49.

ŠIRCA, Saša, UREK, Gregor & KARSSSEN, Gerrit (2004). The incidence of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla* in Slovenia. *Acta agriculturae slovenica* 83 (1), 15 – 22.

TRANTAPHYLLOU, A. C. & HIRSCHMANN, H. (1960). Post-infection development of *Meloidogyne incognita* Chitwood, 1949 (Nematoda: Heteroderidae). *Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki* 3, 1-11.

WILLIAMSON, Valerie Moroz & HUSSEY, Richard S. (1996) Nematode Pathogenesis and Resistance in Plants. *The Plant Cell*, 1735-1745.