



2015



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Interações entre nemátodes-de-quisto da batateira e *Solanum sisymbriifolium*

Ana Teresa Cabral

Interações entre nemátodes-de-quisto da batateira e *Solanum sisymbriifolium*



Ana Teresa Cabral

2015



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Interações entre nemátodes-de-quisto da batateira e *Solanum sisymbriifolium*

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Isabel Luci Pisa Mata da Conceição (Universidade de Coimbra) e Professora Doutora Maria Teresa Batista (Universidade de Coimbra).

Ana Teresa Cabral

2015

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade (COMPETE) e por fundos nacionais através da Fundação para Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto PTDC/AGR-AAM/101817/2008.



Imagem da capa disponível em:

<http://www.saatperle.de/Gesamtliste-Samen-Pflanzen/Litchitomate.html>

“A natureza não faz milagres; faz revelações.”

Carlos Drummond de Andrade

© Averso das coisas. Aforismos, 1987

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de expressar publicamente todo o meu agradecimento a quem me acompanhou no decorrer desta jornada, quer a nível académico quer a nível pessoal. Foram um incentivo fulcral para a elaboração deste trabalho. Sem vós seria uma missão quase impossível.

Em primeiro lugar agradeço aos meus orientadores, que muito me ensinaram ao longo deste percurso, pela sua disponibilidade, incentivo e apoio. À minha orientadora Professora Doutora Isabel Luci Pisa Mata da Conceição, que me acolheu carinhosamente no seu grupo de trabalho, me deu apoio, orientação científica, disponibilidade e perspectiva crítica.

Agradeço também à minha orientadora Professora Doutora Maria Teresa Batista, por todo o apoio e conhecimentos transmitidos e que me recebeu de forma acolhedora no laboratório de Farmacognosia na Faculdade de Farmácias.

À Professora Doutora Isabel Maria de Oliveira Abrantes, pelo acolhimento no Laboratório de Nematologia do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, pela sua simpatia e preocupação. O conhecimento e paixão que ela transmite por todas as áreas do saber científico são contagiantes.

Aos colegas de laboratório, pela sua ajuda, conhecimentos, disponibilidade, simpatia e amizade, a eles serei sempre imensamente grata. Um agradecimento especial à Clara Santos pela preciosa ajuda e disponibilidade.

A toda a gente com quem trabalhei tanto na Escola Superior Agrária de Coimbra, em especial ao Sr. Zé Borrvalho, pela paciência e simpatia em ensinar-me as lides do campo, como nos laboratórios da Universidade de Coimbra onde trabalhei, um agradecimento especial à D. Paula pela amizade e auxílio.

Aos amigos que fiz durante esta aventura académica, em especial a Joana, Liliana e Raphaela, proporcionaram momentos de descontração, diversão e também de aprendizagem. Também por vocês, foi bom regressar a Coimbra.

Aos amigos de sempre e para sempre, agradeço o apoio nas horas difíceis, o incentivo para continuar, as ajudas preciosas e a amizade, sem vocês a minha vida e esta tarefa a que me propus seriam mais difíceis. Um agradecimento ainda mais especial á Rita pela hospitalidade e ajuda.

À Francisca pelos sorrisos, brincadeiras e abraços logo pela manhã.

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha família pelo apoio, amor e amizade incondicional. À minha adorada mãe agradeço também o contributo financeiro para que este sonho se tornasse realidade.

A ti Matias, que vieste dar luz à minha vida e me inspiraste desde o primeiro dia em que soube que vinhas aí...

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
ÍNDICE	III
LISTA DE ABREVIATURAS	V
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Nemátodes-de-quisto da batateira (NQB), <i>Globodera</i> spp.	3
1.2. Origem e especiação.....	3
1.3. Distribuição mundial	4
1.4. Identificação dos nemátodes-de-quisto da batateira.....	5
1.5. Biologia	6
1.5.1 Ciclo de Vida	6
1.5.2 Dinâmica populacional	8
1.6. Ecologia.....	8
1.7. Modo de infecção.....	9
1.8. Meios de controlo.....	9
1.9. Origem e distribuição da batata.....	12
1.10. <i>Solanum sisymbriifolium</i> – alternativa biológica contra os nemátodes-de-quisto da batateira.....	13
1.11. Importância do estudo	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1. Obtenção de exsudato de batateira, <i>Solanum tuberosum</i> cv. Désirée	19
2.2. Manutenção dos isolados de <i>Globodera pallida</i> e <i>G. rostochiensis</i> em laboratório	21
2.3. Identificação molecular das espécies de nemátodes-de-quisto da batateira, <i>Globodera</i> spp., através de PCR – RFLP	23
2.4. Patogenicidade de <i>G. pallida</i> e <i>G. rostochiensis</i> em <i>S. sisymbriifolium</i> cv. Melody, Pion, Sharp, Sis 4004 e Sis 6001 em estufa.....	24

2.5.	Contagem dos jovens do segundo estágio (J2) segundo a metodologia de Sheperd (1986).	25
2.6.	Avaliação do efeito de <i>Solanum sisymbriifolium</i> em <i>Globodera pallida</i> e <i>G. rostochiensis</i> -ensaios de campo	26
2.7.	Obtenção dos extratos do fruto verde de <i>Solanum sisymbriifolium</i> cv. Melody e Sis 6001	31
2.8.	Testes de eclosão	34
2.9.	Teste de mortalidade	35
2.10.	Cromatografia em camada fina, TLC (<i>Thin-layer chromatography</i> – Cromatografia em camada fina): pesquisa de fitoquímicos no fruto verde de <i>S. sisymbriifolium</i>	36
2.10.1	Preparação das amostras e dos reveladores	38
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1.	Identificação molecular das espécies de nemátodes-de-quisto da batateira, <i>Globodera</i> spp., através de PCR – RFLP	43
3.2.	Patogenicidade de <i>Globodera pallida</i> e <i>G. rostochiensis</i> em <i>S. sisymbriifolium</i> cvs Melody, Pion, Sharp, Sis 4004 e Sis 6001 em estufa	45
3.3.	Avaliação do efeito de <i>S. sisymbriifolium</i> em <i>G. pallida</i> e <i>G. rostochiensis</i> - ensaios de campo	47
3.4.	Extratos do fruto verde de <i>Solanum sisymbriifolium</i> cv. Melody e Sis 6001	52
3.4.1	Determinação do peso seco do fruto verde de <i>Solanum sisymbriifolium</i>	52
3.4.2	Determinação do rendimento extrativo do fruto verde	53
3.5.	Testes de eclosão de <i>Globodera pallida</i>	53
3.6.	Testes de mortalidade de <i>Globodera pallida</i>	55
3.7.	TLC: fitoquímicos do fruto verde de <i>Solanum sisymbriifolium</i> cv. Melody e Sis 6001	56
3.7.1	Observação na câmara dos Ultra-violeta (UV)	56
3.7.2	Aplicação dos reveladores	57
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **ADNr:** Ácido desoxirribonucleico ribossómico
- **ANOVA:** análise de variância
- **BSA:** *Bovine Serum Albumin* (Albumina sérica bovina)
- **C:** concentração
- **Cv.:** cultivar
- **Cvs:** cultivares
- **E:** eclosão
- **EC:** eclosão cumulativa
- **EDTA:** *ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etilenodiaminotetracético)
- **FAO:** *Food and Agriculture Organization* (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
- **Gp:** *Globodera pallida*
- **Gr:** *Globodera rostochiensis*
- **IC:** inibição da eclosão cumulativa corrigida
- **IE :** inibição da eclosão cumulativa
- **IE:** inibição da eclosão cumulativa no extrato
- **IT:** inibição da eclosão cumulativa no controlo
- **ITS:** *Internal Transcribed Spacer* (espaçador transcrito interno)
- **J2:** jovens do segundo estágio de desenvolvimento
- **LSD:** *Fishers Least Significant Difference* (teste da diferença mínima significativa)
- **MS:** massa seca
- **n°:** número
- **NQ:** número de quistos
- **NQB:** nemátodes-de-quisto da batateira
- **P:** população
- **P1:** população após colheita de *Solanum tuberosum*
- **P2:** população após colheita de *S. sisymbriifolium*

- **pb:** pares de bases
- **PCN:** potato cyst nematode
- **PCR:** *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da Polimerase)
- **PCR-RFLP:** *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (Reação em cadeia da Polimerase - Polimorfismos dos Fragmentos de ADN obtidos por enzimas de restrição)
- **Pf:** população final
- **Pi:** população inicial
- **Rf:** *Retention factor* (fator de retenção)
- **S:** sul
- **sp.:** *specie* (espécie)
- **spp:** *species* (espécies)
- **TBE:** Tris-borato-EDTA
- **TE:** Tris + EDTA
- **TLC:** *Thin-layer chromatography* (Cromatografia em camada fina)
- **Tris:** 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
- **UV:** ultra violeta

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Lista de compostos químicos de *Solanum sisymbriifolium*.

Tabela II: Constituição da mistura contendo as enzimas de restrição *HinfI* e *AluI*

Tabela III: Esquema dos talhões no campo de Bolho e Barcouço

Tabela IV: Parâmetros dos talhões onde as cultivares de *Solanum sisymbriifolium* foram semeados nos campos de Bolho e Barcouço

Tabela V: Cronologia dos acontecimentos nos anos 2012 a 2015 nos campos de Bolho e Barcouço

Tabela VI: Fórmulas de cálculo dos parâmetros usados para determinar o peso seco do fruto verde de *Solanum sisymbriifolium*

Tabela VII: Relação massa de fruto fresco / volume de solvente extrativo usados para cada uma das cultivares (Melody e Sis 6001) de *Solanum sisymbriifolium*

Tabela VIII: Eluentes e fase estacionária usados na aquisição dos perfis cromatográficos para os extratos de *Solanum sisymbriifolium*

Tabela IX: Reveladores para saponósitos e alcalóides: constituição, aplicação e resultados esperados

Tabela X: Tamanho dos fragmentos de ADNr amplificados e comprimento dos fragmentos após digestão com as enzimas de restrição *AluI* e *HinfI* para as duas espécies: *Globodera pallida* e *G. rostochiensis* (Sirca et al., 2010)

Tabela XI: Patogenicidade de *Globodera pallida* em *Solanum sisymbriifolium*

Tabela XII: Patogenicidade de *Globodera rostochiensis* em *Solanum sisymbriifolium*

Tabela XIII: Análise físico-química dos solos de Bolho e Barcouço (2012)

Tabela XIV: Caracterização dos tubérculos de *S. tuberosum* cv. Désirée colhidos nos campos de Bolho e Barcouço nos ensaios de campo (valores médios de 10 exemplares)

Tabela XV: Determinação do peso seco do fruto verde de *Solanum sisymbriifolium* para as cultivares Melody e Sis 6001

Tabela XVI: Peso do fruto fresco e do extrato (líoofilizado) obtido para cada cultivar de *S. sisymbriifolium* e rendimento extrativo

Tabela XVII: Valores do R_f para o extrato de fruto verde de *S. sisymbriifolium* usando o eluente clorofórmio-metanol-água (70:30:5)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida dos nemátodes-de-quisto da batateira, *Globodera* spp. (Adaptado de <http://www.madrimasd.org/>)

Figura 2: *Solanum sisymbriifolium*. **A:** Flor; **B e D:** Fruto envolto por um cálice espinhoso; **C:** aspeto geral da planta.

Figura 3: Crivo com quistos de *Globodera pallida* submersos em exsudato radicular da batateira, *Solanum tuberosum* cv. Désirée

Figura 4: Levigador de Fenwick.

Figura 5: Campo agrícola situado em Bolho (Cantanhede)

Figura 6: Campo agrícola situado em Barcouço (Mealhada)

Figura 7: Obtenção do extrato do fruto de *Solanum sisymbriifolium* por decocção.

Figura 8: Concentração de uma amostra num evaporador rotativo

Figura 9: Esquematização das diluições de cada uma das cultivares (Melody e Sis 6001) de *Solanum sisymbriifolium* usadas no ensaio realizadas a partir da solução *stock*.

Figura 10: Esquematização da TLC (*Thin Layer Chromatography* - Cromatografia em camada fina) **1:** Câmara cromatográfica; **2:** Placa de sílica; **3:** Ponto de aplicação das amostras; **4:** Fase móvel.

Figura 11: Esquematização da placa de sílica. **1:** Linha de frente da fase móvel; **2:** Ponto de aplicação da amostra; **3:** Nível a que deve ficar a fase móvel na câmara cromatográfica; **d_m:** distância percorrida pela fase móvel; **d_s:** Distância percorrida pelo composto.

Figura 12: Amplificação dos fragmentos de ADNr ITS **Gp1-Gp5:** *Globodera pallida*; **GrA-GrE:** *G. rostochiensis*; **+**: controlo positivo; **-:** controlo negativo; **M:** Hyper Ladder™II

Figura 13: Caracterização molecular dos isolados/populações de *Globodera* usando as enzimas de restrição *AluI* e *Hinfl*. **Gp1-Gp5:** *G. pallida*; **GrA-GrE:** *G. rostochiensis*; **M:** Hyper Ladder™II.

Figura 14: Número de J2/100cm³ de *G. pallida* no campo do Bolho (A) e *G. rostochiensis* no campo de Barcouço (B). **P1:** população de nemátodes após colheita de *Solanum tuberosum*; **P2:** população de nemátodes após *Solanum sisymbriifolium*; Melody, Pion, Sharp, Sis 4004 e Sis 6001 - cultivares de *S. sisymbriifolium* em estudo. **B/N:** Batatas/Nada; **N/N:** Nada/Nada estes talhões foram usados como controlo do ensaio. Os valores são médias de três repetições ± erro padrão.

Figura 15: Inibição da eclosão cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925) com os respetivos erros padrão para o extrato de fruto verde de *Solanum sisymbriifolium* cv. Sis6001.

Figura 16: Inibição da eclosão cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925) com os respetivos erros padrão para o extrato de fruto verde de *Solanum sisymbriifolium* cv. Melody.

Figura 17: Cromatograma dos extratos observado aos UV. Em que **A** representa a amostra da cultivar Sis 6001 e **B** amostra da cultivar Melody, no eluente clorofórmio-metanol-água (65:50:10)

Figura 18: Perfil cromatográfico obtido por TLC (*Thin Layer Chromatography* – Cromatografia em camada fina) em placa de sílica GF₂₅₄ desenvolvida com clorofórmio-metanol-água (65:50:10), após revelação com vanilina e ácido sulfúrico, com o registo dos respetivos valores de R_f.

Figura 19: Perfil cromatográfico obtido por TLC (*Thin Layer Chromatography* – Cromatografia em camada fina) em placa de sílica GF₂₅₄ desenvolvida com o eluente clorofórmio-metanol-água (70:30:5) e revelação pelo ácido sulfúrico a 50 %, com o registo dos respetivos valores de R_f.

Figura 20: Estrutura da solamargina (Bagalwa *et al.*, 2010).

RESUMO

Os nemátodes-de-quisto da batateira (NQB), *Globodera pallida* e *G. rostochiensis*, são importantes parasitas das batateiras e têm um enorme impacto económico. O seu controlo é difícil e depende de muitos fatores. A melhor opção é a utilização conjunta de vários métodos. É cada vez mais importante e urgente encontrar meios de luta amigos do ambiente. O desenvolvimento de estratégias de controlo para minimizar os danos causados por estes fitoparasitas é imperativo. Nematodocidas químicos, cultivares resistentes, rotação de culturas, fungos e bactérias inimigas naturais dos NQB, biofumigantes e plantas-armadilha fazem parte do conjunto de estratégias integradas usadas contra estes nemátodes. As legislações europeias, e não só, têm vindo a ser cada vez mais exigentes quanto às restrições do uso de produtos químicos. As cultivares resistentes, apesar de eficientes, não podem ser consideradas como uma alternativa a longo prazo na medida que a resistência pode ser quebrada. A rotação de culturas não é economicamente viável, pois são necessários vários anos de rotação para que os NQB deixem de ser considerados ameaça. Os inimigos naturais e biofumigantes têm vindo a mostrar bons resultados no combate contra os NQB mas em situações restritas. Os exsudatos radiculares das Solanaceas promovem a eclosão dos jovens do segundo estágio dos NQB. A batateira, *S. tuberosum*, planta hospedeira, pode ser usada como planta armadilha, contudo não é o ideal pois requer um controlo muito rigoroso para que a cultura seja destruída a tempo antes de os NQB se reproduzirem. *Solanum sisymbriifolium* mostrou ser uma boa planta-armadilha, pois é resistente aos NQB, promovendo a sua eclosão e impedindo que os nemátodes completem o seu ciclo de vida. O objetivo deste trabalho foi estudar algumas das interações entre os NQB e a planta armadilha *Solanum sisymbriifolium*, já utilizada em alguns países para controlo destes nemátodes. Neste trabalho, testou-se a patogenicidade de dois isolados de NQB, um de *G. pallida* e outro de *G. rostochiensis* em relação a *S. sisymbriifolium* em condições controladas. A planta foi considerada resistente aos NQB. Avaliou-se também o efeito de *S. sisymbriifolium* na densidade populacional de *G. rostochiensis* e *G. pallida* em ensaios de campo. A identificação das espécies de NQB foi feita por PCR-RFLP sendo a população de Barcouço identificada como *G. rostochiensis* e a do

Bolho como *G. pallida*. Os resultados mostraram que *S. sisymbriifolium* tem potencial para ser usada como planta-armadilha em Portugal. Por fim, testou-se o efeito dos extratos do fruto verde (com maior atividade biológica) de *S. sisymbriifolium* na inibição da eclosão e mortalidade dos NQB. A inibição da eclosão cumulativa foi baixa, e não se verificou efeito na mortalidade. Concentrações mais elevadas devem ser testadas e efetuados testes de viabilidade. Em todos os ensaios, exceto nos da mortalidade, *S. tuberosum* cv. Désirée foi usada como controlo. A identificação dos fitoquímicos presentes no fruto verde revelou a existência de saponósidos e alcalóides, ambos de natureza esteróide, sendo que um dos alcalóides pode corresponder à solamargina. Este estudo vem complementar outros já efetuados e demonstrar que a planta *S. sisymbriifolium* pode ser utilizada como um meio de luta contra os NQB sendo um método amigo do ambiente desde que sejam tomadas as devidas precauções de implementação da planta na flora local.

Palavras-chave: eclosão, mortalidade, nemátodes-de-quisto da batateira (NQB), resistência, *Solanum sisymbriifolium*.

ABSTRACT

Potato Cyst Nematodes (PCN), *Globodera pallida* and *G. rostochiensis*, are the main parasites of potato crops and consequently can have a huge economic impact. The restraint of these pests is difficult and depends on several factors. The best option is therefore the joint use of various methods. It is paramount to find more environmentally friendly ways to fight them. The development of control strategies to minimize the damage caused by these plant parasites is imperative. Chemical nematicides, resistant cultivars, crop rotation, fungi and bacteria that are natural enemies to PCN, biofumigation and trap-crops are part of the integrated set of strategies used against these nematodes. European legislation and others, have been increasingly demanding the restriction of the use of chemicals. Resistant cultivars although efficient can not be considered as a long term alternative to the extent that the resistance can be broken. Crop rotation is not economically viable because it takes several years of rotation for PCN to no longer be considered threatening. Natural enemies and biofumigation have been showing good results in the fight against PCN but in limited situations. The root exudates of the *Solanaceas* promote hatching of second stage juveniles of PCN. Potato, *S. tuberosum*, host plant, can be used as a trap crop, but is not ideal as it requires a very strict control, the crop has to be destroyed before nematodes are able to reproduce. *Solanum sisymbriifolium* proved to be a good trap-crop because it is resistant to PCN, promoting the hatching but preventing nematodes to complete their life cycle. The objective of the study was to understand some of the interactions between the PCN and the trap-crop *Solanum sisymbriifolium*, already used in some countries as means of controlling these nematodes. In this study, the pathogenicity of two PCN isolates, *G. pallida* and *G. rostochiensis* was tested in relation to *S. sisymbriifolium* in greenhouse. The plant was considered resistant to PCN. The effect of *S. sisymbriifolium* in the population density of *G. rostochiensis* and *G. pallida* was also assessed in field trials. The identification of species of PCN was made by PCR-RFLP. The population of Barcouço was identified as *G. rostochiensis* and the Bolho population as *G. pallida*. The results showed that *S. sisymbriifolium* has the potential to be used as trap-crop in Portugal. Finally, the effect of the unripe fruit extracts (with higher biological activity)

of *S. sisymbriifolium* in inhibiting hatching and on the mortality of the PCN was evaluated. The cumulative inhibition of hatching was low and there was no effect on mortality. Higher concentrations should be tested and viability tests performed. In all the tests, except in mortality, *S. tuberosum* cv. Désirée was used as a control group. The identification of the phytochemicals present in unripe fruit revealed the existence of alkaloids and saponosides, both natural steroids. One of the alkaloids present may correspond to solamargine. This work complements others that have been made and demonstrates that the plant *S. sisymbriifolium* can be used as a mean of fighting the PCN being an environmentally friendly method as long as the proper implementation precautions are taken in local flora.

Keywords: hatching, mortality, Potato Cyst Nematode (PCN), resistance, , *Solanum sisymbriifolium*.



1. INTRODUÇÃO

1.1. NEMÁTODES-DE-QUISTO DA BATATEIRA (NQB), *GLOBODERA* SPP.

Os nemátodes, são ecologicamente muito bem-sucedidos o que se pode ver pela diversidade de espécies existentes dentro do filo. Podem ser encontrados em todos os habitats. A maioria dos nemátodes são de vida livre, contudo existem espécies parasitas, tanto de animais como de plantas. Os nemátodes-de-quisto da batateira (NQB), *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923), Skarbilovich, 1959 e *G. pallida* (Stone, 1973), pertencem à ordem Tylenchida e família Heteroderidae (EPPO, 2013). São fitoparasitas obrigatórios e sedentários. (Foot, 1977; Williamson & Hussey, 1996; Marks & Brodie, 1998; Williamson & Gleason, 2003; EPPO, 2013).

São os principais responsáveis pelas perdas, a nível mundial, na produção de batata, (Skantar, *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 2014; Watts, *et al.*, 2014). Hipoteticamente, em todos os países em que se semeie batata, há danos causados pelos NQB (Cunha, *et al.*, 2012). Desta forma estas espécies adquiriram o estatuto de espécies de quarentena (EPPO, 2013). A batalha pela sua deteção e controlo passa por duas vias: manter a produção económica de batata comestível e garantir que os tubérculos se mantenham descontaminados com o objetivo de prevenir a dispersão dentro e fora de fronteiras (Marks & Brodie, 1998).

Devido ao seu reduzido tamanho, taxa de reprodução elevada na presença de hospedeiro, capacidade de sobrevivência mesmo na ausência de hospedeiro no solo e a sua grande especialização fazem dos NQB um grande problema para os agricultores e legisladores a nível mundial (Marks & Brodie, 1998).

1.2. ORIGEM E ESPECIAÇÃO

A sua origem remonta à região dos Andes, América do Sul (Mai, 1976; Marks & Brodie, 1998; Holgado & Magnusson, 2010) mais precisamente na área planáltica do lago Titicaca no sul do Perú (Abreu & Santos, 1989) tendo sido introduzidos na Europa depois de 1850 juntamente com a batata (Marks & Brodie, 1998; Holgado & Magnusson, 2010). Os NQB espalharam-se por todo o mundo inicialmente através do solo infestado que envolvia os tubérculos, (Marks & Brodie, 1998), pela reutilização de sacos nos quais se fazia o transporte das batatas e através do movimento da maquinaria agrícola entre os locais afetados e não afetados (Mai, 1976, EPPO, 2013).

A distribuição das duas espécies de NQB na América do Sul não é uniforme, sendo difícil de explicar pois as duas espécies ocupam quase precisamente os mesmos nichos ecológicos. A separação das espécies parece dar-se por volta da latitude 15-16° S, onde se localiza o lago Titicaca e onde *G. pallida* e *G. rostochiensis* coexistem com o hospedeiro principal, *Solanum tuberosum*. Para norte desta latitude apenas se tem detetado *G. pallida* enquanto para sul se encontram as duas espécies. No Chile, Venezuela, América Central e México só se tem encontrado *G. rostochiensis*. Na base da especiação pode estar a diferente necessidade das espécies quanto ao fotoperíodo e à barreira natural dos Andes aliada às grandes dimensões do lago Titicaca (Marks & Brodie, 1998).

1.3. DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL

Os NQB já foram detetados em pelo menos 65 países, incluindo Portugal (Cunha *et al.* 2004). *Globodera rostochiensis* encontra-se em todos os países afetados, enquanto *G. pallida* se encontra em apenas alguns dos países como, por exemplo, Inglaterra, Holanda e Portugal. Em nenhum dos locais parece haver introdução só de *G. pallida*, contudo é possível encontrar misturas das duas espécies (Marks & Brodie, 1998). Graças à sua grande capacidade de sobrevivência, os NQB encontram-se em locais inóspitos como, por exemplo, a alguns quilómetros a norte do Círculo Polar Ártico, onde a temperatura média anual ronda os 0,6°C (Abreu & Santos, 1989).

A primeira referência à presença dos NQB em Portugal remonta a 1956 na zona de Bragança. Contudo pensa-se que a introdução tenha sido anterior a esta data, tendo os nemátodes oportunidade de se dispersar pelos terrenos de cultivo. Todas as populações foram identificadas como pertencentes à espécie *G. rostochiensis*. Só mais tarde foi verificada a presença de *G. pallida* em campos de Trás-os-Montes e Alto Douro, zona do país onde há grande produção de batata (Santos & Fernandes, 1988; Abreu & Santos, 1989; Santos *et al.* 1995).

Cerca de metade das populações de NQB presentes em Portugal Continental e Madeira parecem ser populações puras de *G. rostochiensis* (Santos *et al.* 1995; Cunha *et al.*, 2004). A média nacional de área infestada ronda os 50% dos campos de cultivo sendo que em algumas áreas atinge mesmo os 100% (Cunha *et al.*, 2004).

1.4. IDENTIFICAÇÃO DOS NEMÁTODES-DE-QUISTO DA BATATEIRA

A similaridade morfológica e biológica entre as duas espécies dos NQB levou a que inicialmente fossem consideradas como uma única espécie, *Heterodera rostochiensis*, Wollenweber (1923). Mais tarde, este pressuposto foi questionado à medida que vários cientistas foram encontrando diferenças nas diversas populações destes nemátodes. A acumulação de evidências de heterogeneidade dentro de *H. rostochiensis* levou à descrição de duas espécies semelhantes: *H. rostochiensis* e *H. pallida* (Stone, 1973). Subsequentemente, estas duas espécies foram incluídas no género *Globodera* (Mulvey & Stone, 1976) juntamente com outros nemátodes com quistos redondos. O género *Globodera* inclui uma dúzia de espécies sendo que *G. pallida* e *G. rostochiensis* são as que causam maior impacto económico (Marks & Brodie, 1998).

Contudo, as similaridades morfológicas dentro das espécies do género *Globodera*, e outros grupos de espécies continuam a ser complicadas de resolver pois, podem apresentar implicações na gestão agrícola. Como exemplo disso, temos *G. tabacum*, com incidência geográfica na América do Norte e América Central, que pode facilmente ser confundida morfológicamente com os NQB (Marks & Brodie, 1998).

Para a correta aplicação de medidas racionais de luta contra os NQB é necessário distingui-los de outros nemátodes-de-quisto (Skantar, *et al.*, 2007).

Globodera pallida e *G. rostochiensis* podem ser distinguidos com base na sua morfologia, para isso é necessário obter quistos e jovens do segundo estágio (J2) de desenvolvimento a partir do solo, raízes e tubérculos de batateiras (Carta & Handoo, 2005; EPPO, 2013). A cor é um dos indicadores morfológicos que pode ser usado na distinção das duas espécies, a fêmea cuja cor muda ao longo da sua maturação de branco para amarelo e desta cor passar para um quisto castanho pertence à espécie *G. rostochiensis*, enquanto as fêmeas de *G. pallida* mudam de branco diretamente para quistos castanhos (EPPO, 2013). Outras características analisadas são: o número de cumes cuticulares entre o ânus e a fenestra no quisto, a região anterior e corpo do J2, forma e tamanho da cauda (Mai, 1977; Carta & Handoo, 2005). Contudo, os NQB são muito difíceis de distinguir morfológicamente, principalmente porque existe grande variabilidade intraespecífica (EPPO, 2013). A confirmação molecular torna-se assim indispensável e complementar à análise morfológica, principalmente quando se suspeita de novas introduções (Carta & Handoo, 2005; Skantar *et al.*, 2007; EPPO, 2013).

Vários estudos evidenciam que os genes do ADNr são eficazes na identificação de *Globodera* spp. (Ferris *et al.*, 1993; Mulholland *et al.*, 1996; Bulman & Marshall, 1997; Subbotin *et al.*, 2000; Sirca & Urek, 2004). A região ITS tem vindo a ser usada para identificar *G. pallida* e *G. rostochiensis* em populações mistas (Mulholland *et al.*, 1996; Bulman & Marshall, 1997; Fullaondo *et al.*, 1999; Madani *et al.*, 2008). Mais recentemente a técnica de PCR-RFLP (Reação em cadeia da Polimerase, *Polymerase Chain Reaction* – Polimorfismos dos Fragmentos de ADN obtidos por enzimas de restrição, *Restriciton Fragment Lenght Polymorfism*) separa claramente *G. pallida* de *G. rostochienesis* (Subbotin *et al.*, 2000) e tem vindo a ser utilizada em diferentes países, pois é uma técnica que permite fazer uma análise direta ao ADN dos organismos.

1.5. BIOLOGIA

Os NQB são geralmente pragas de regiões com climas temperados, contudo eles são capazes de se adaptar a outras áreas. São essencialmente parasitas das raízes, podendo aparecer, em menor quantidade, em outras partes da planta (Marks & Brodie, 1998).

1.5.1 CICLO DE VIDA

Os NQB passam parte da sua vida ativa dentro das raízes das plantas hospedeiras, alimentando-se delas e alterando-as de forma radical. Como quase todos os nemátodes, os NQB têm quatro estádios juvenis e uma fase adulta (Williamson & Hussey, 1996; Marks & Brodie, 1998).

A fase infetiva começa com a eclosão dos jovens do segundo estádio (J2). A eclosão é estimulada por exsudatos da raiz da planta hospedeira. Os nemátodes entram na raiz e movem-se até ao cilindro vascular, perfurando as células por onde passam. Uma vez no cilindro vascular, estabelecem um local de alimentação, injetando secreções do estilete. A formação do local de alimentação é caracterizada pela demolição das paredes celulares entre o local inicial de infeção e a sua vizinhança, formando-se assim um *syncytium* multinuclear que garante suplemento nutritivo para os

nemátodes. (Williamson & Hussey, 1996; Marks & Brodie, 1998; Williamson & Gleason, 2003; Castelli *et al.*, 2005).

Após o início da alimentação, o nemátode torna-se sedentário e sofre as restantes mudas até à fase adulta. As fêmeas adultas são redondas e imóveis. A produção de ovos começa entre as 3 e as 6 semanas após a infecção, dependendo da espécie e das condições ambientais (Williamson & Hussey, 1996; Marks & Brodie, 1998). Os NQB reproduzem-se sexuadamente. As fêmeas recetivas libertam feromonas sexuais que atraem os machos nas proximidades presentes no solo (Marks & Brodie, 1998). Após a fecundação os ovos desenvolvem-se no interior da fêmea (200 a 500) que morre. A cutícula torna-se mais espessa e a fêmea transforma-se num quisto protetor para os ovos (Marks & Brodie, 1998; Williamson & Gleason, 2003). O sexo é determinado epigeneticamente, isto é, depende das condições ambientais (Timmermans, 2005). Quando há escassez nutricional há maior abundância de machos, enquanto as fêmeas só surgem quando há alta disponibilidade nutricional (Williamson & Hussey, 1996; Marks & Brodie, 1998) (Fig. 1).

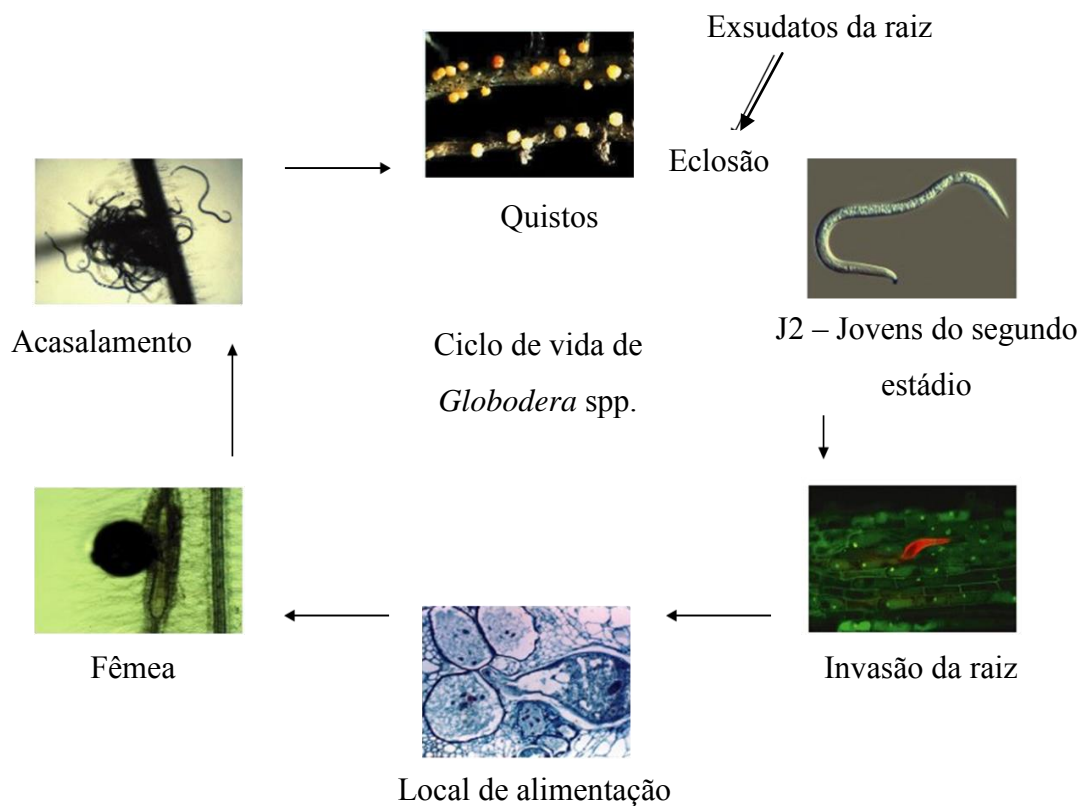


Figura 1: Ciclo de vida dos nemátodes-de-quisto da batateira, *Globodera* spp. (Adaptado de <http://www.madrimasd.org/>)

1.5.2 DINÂMICA POPULACIONAL

Na ausência de um hospedeiro compatível, os quistos podem manter-se no solo durante 20 a 30 anos. Os J2 uma vez desenvolvidos dentro dos quistos, entram num estado de dormência chamado de diapausa, e independentemente das condições ambientais, eles não eclodem até que a diapausa termine mesmo na presença de estímulos de eclosão (Marks & Brodie, 1998).

Na presença de exsudatos radiculares de uma planta hospedeira e em solos arenosos temos a taxa mais elevada de eclosão, contudo, esta nunca chega aos 100%, pois os NQB têm como estratégia de sobrevivência, a manutenção de alguns juvenis em diapausa, durante algum tempo, antes de eclodirem, mantendo assim as populações de campo viáveis durante anos (Marks & Brodie, 1998).

A taxa de multiplicação dos NQB no terreno depende da densidade populacional inicial e do tamanho da raiz da planta hospedeira, pois a competição por espaço livre na raiz influencia a relação em causa (Marks & Brodie, 1998, Timmermans, 2005).

1.6. ECOLOGIA

As espécies mais suscetíveis aos NQB são o tomateiro, *Solanum lycopersicum*, a beringela, *S. melongena*, mas é a batateira, *S. tuberosum*, a mais susceptível das três (Mai, 1977).

A baixas densidades populacionais de NQB as plantas suscetíveis conseguem tolerar a sua invasão e os danos por eles causados sem afetar o seu desenvolvimento. As plantas respondem aumentando o tamanho das suas raízes e o desenvolvimento de raízes laterais. Contudo, à medida que a invasão pelo nemátode aumenta a planta tende a deixar de conseguir compensar o problema e começa a manifestar sintomas da doença (Marks & Brodie, 1998; Timmermans, 2005). Os sintomas manifestados pelas plantas não são específicos podendo ser facilmente confundidos com outras doenças, a planta tem um atraso no crescimento, senescência precoce, amarelecimento das folhas, diminuição da taxa fotossintética e maior suscetibilidade para ser invadida por outros agentes patogénicos, (Williamson & Hussey, 1996; Marks & Brodie, 1998; Cunha *et al.*, 2012; EPPO, 2013; Watts *et al.*, 2014).

1.7. MODO DE INFEÇÃO

Os NQB estabelecem interações muito específicas com os seus hospedeiros que geralmente levam a modificações morfológicas duradouras em ambos os organismos. Durante a infeção ocorrem mudanças morfológicas na raiz da planta hospedeira, principalmente nas células que irão ser o local de alimentação do nemátode (Williamson & Hussey, 1996) Eles apresentam duas estruturas especializadas responsáveis pela fase inicial do parasitismo: o estilete e as glândulas secretoras esofágicas. O estilete é a estrutura que permite perfurar as paredes das células e o conteúdo das glândulas é libertado para as células gigantes recém-formadas através do estilete (Williamson & Hussey, 1996). As complexas mudanças morfológicas e genéticas que ocorrem durante o estabelecimento do local de alimentação são o reflexo das alterações genéticas do hospedeiro (Williamson & Hussey, 1996; Williamson & Gleason, 2003).

1.8. MEIOS DE CONTROLO

Os NQB existem em quase todos os países onde a batata é cultivada (EPPO, 2013). Têm por isso um grande impacto económico nos países produtores da batata semente. O seu controlo é difícil dada a natureza do nemátode, que nas suas primeiras fases de vida se encontra dentro de um quisto, protegido das condições adversas e também pela sua capacidade de sobreviver no solo durante anos sem a planta hospedeira (Marks & Brodie, 1998). De forma a prevenir o problema, a União Europeia redigiu uma Diretiva, que tem como principal objetivo estabelecer medidas de controlo contra estes nemátodes a fim de determinar a sua distribuição, evitar a sua propagação e definir meios de combate (Diretiva 2007/33/EC).

Distinguir os NQB de outros nemátodes formadores de quisto, como já foi referido, é crucial para garantir a eficácia das medidas estabelecidas por cada país (Skantar *et al.*, 2007).

As estratégias de luta passam primeiro por evitar a disseminação dos nemátodes para terrenos não contaminados, diminuir as populações de nemátodes nos terrenos contaminados e evitar o transporte de solo infetado, quer através da maquinaria agrícola, quer através dos tubérculos e outros materiais (Mai, 1977; Marks & Brodie, 1998; Holgado & Magnusson, 2010).

O uso de nematocidas químicos é eficaz como meio de luta para erradicar os nemátodes, contudo, a legislação Europeia é bastante restrita quanto ao uso de nematocidas em solo Europeu, focando essencialmente problemas de segurança ambiental e riscos para a saúde (Renčo *et al.*, 2014). Em condições ótimas os fumigantes podem reduzir as populações de NQB até 80%, e com a vantagem de requerer curtos períodos de rotação de culturas. Contudo, na prática, estes valores de redução populacional não se verificam fazendo com que a relação custo/benefício seja baixa (Schomaker & Been, 1999).

A rotação de culturas com espécies não suscetíveis ao nemátode é uma das estratégias usadas, contudo é um processo pouco viável economicamente e mal visto entre os agricultores devido ao elevado tempo de rotação necessário para que os NQB deixem de ser considerados ameaça (www.inia.pt; Cunha *et al.*, 2012; Wood *et al.*, 2014).

O uso de cultivares resistentes tem vindo a ser usado como estratégia de combate, evitando desta forma os nematocidas químicos (Kaplan & Keen, 1980; Roberts, 1992; Williamson & Hussey, 1996). Contudo este método não pode ser considerado permanente (Timmermans, 2005), havendo populações de nemátodes capazes de quebrar essa resistência (Roberts, 1992; Cunha *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2012). A mistura de espécies no terreno também dificulta o sucesso das cultivares resistentes, pois nem sempre estas são resistentes às duas espécies de NQB. É importante conhecer a diversidade genética presente nas populações de campo e definir os grupos de virulência dessas mesmas populações (Cunha *et al.*, 2012). A utilização de cultivares resistentes a uma das espécies pode fazer com que a outra se torne dominante no campo, tal facto já foi verificado em países como Inglaterra. A isto acresce o problema de *G. pallida* ser mais difícil de controlar devido à maior heterogeneidade das populações e maior número de grupos de virulência (Scholte, 2000a; Cunha *et al.*, 2004; Timmermans, 2005; Sasaki-Crawley *et al.*, 2010).

Atualmente têm vindo a ser desenvolvidas outras alternativas de controlo, entre elas o recurso a plantas-armadilha (Scholte, 2000a; Timmermans, 2005; Holgado & Magnusson, 2010; Sasaki-Crawley *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2012) que se revelam resistentes a populações de NQB e cujos exsudatos da raiz estimulam a eclosão dos J2 evitando a sua reprodução (Scholte & Vos, 2000; Timmermans, 2005; Sasaki-Crawley *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2012; Renčo *et al.*, 2014) e ainda a utilização de agentes biológicos como fungos e bactérias que por partilharem a rizosfera com os nemátodes

estão em contante interação. Fungos nematofágicos como *Plectosphaerella cucumerina* têm mostrado bons resultados diminuindo as populações de NQB em cerca de 60% (Siddiqui & Mahmood, 1996; Atkins *et al.*, 2003). *Pochonia chlamydosporia*, inimigo natural dos NQB, tem mostrado resultados positivos na diminuição da taxa de multiplicação destes nemátodes (Tobin *et al.*, 2008). *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Streptomyces* são bactérias que também têm potencial nematodocida (Siddiqui & Mahmood, 1999).

Sabe-se que as espécies da família Solanaceae produzem agentes que provocam a eclosão dos NQB. Scholte (2000a,b,c) demonstrou que a batateira pode ser usada como planta-armadilha, contudo não é a planta ideal, pois sendo uma planta suscetível às duas espécies, existe dificuldade em determinar o momento exato para a sua destruição antes de as fêmeas adultas se desenvolverem. Há também o risco de permanecerem restos de batata no solo que eventualmente poderão ser hospedeiras do parasita no ano seguinte e desta forma tornarem-se focos de multiplicação dos NQB (Scholte, 2000a; Timmermans, 2005; Dias *et al.*, 2012). Após diversos estudos testando o potencial das Solanaceae, *Solanum sisymbriifolium* mostrou ser uma planta-armadilha promissora (Scholte, 2000b.c; Timmermans, 2005).

Uma outra alternativa biológica na luta contra estes nemátodes é a biofumigação usando compostos inofensivos para o ambiente. Segundo Lord *et al.*, (2011), esta técnica representa uma potencial alternativa para o controlo de pestes. O uso de cultivares de batata geneticamente modificadas também é uma das alternativas de controlo futuras. Nas condições de campo, estas têm que se mostrar eficientes no controlo do NQB e ser amigas do ambiente (Green *et al.*, 2012).

A eficiência das medidas contra NQB aumenta quando existe um plano de estratégia integrado em que se combinam vários meios de combate (Marks & Brodie, 1998; Tobin *et al.*, 2008) e só assim se poderão obter resultados concretos.

1.9. ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO DA BATATA

Tal como foi referido anteriormente, a batata é a espécie mais suscetível aos NQB (Mai, 1977). Segundo o referido pela FAO, a batata constitui a maior plantação alimentícia a nível mundial (Marks & Brodie, 1998) sendo por isso importante perceber a sua origem e disseminação pelo mundo. As batatas, *S. tuberosum*, pertencem à extensa família das Solanaceas. Os tubérculos são o seu meio de propagação por excelência. Segundo Hawkes (1978), as batatas surgiram há cerca de 8000 anos atrás na América do Sul, nos vales dos Andes.

A batata foi introduzida na Europa, especificamente em Espanha e Inglaterra, no fim do século XVI, aquando a invasão do Peru levada a cabo pelos Espanhóis. Contudo os primeiros campos de cultivo não foram bem-sucedidos nem tão pouco as batatas usadas como bem alimentar devido às condições climáticas e número de horas de fotoperíodo do continente europeu. As plantações de batata começaram a ser melhor sucedidas em climas mais moderados como no sul de França e Irlanda (Marks & Brodie, 1998; Timmermans, 2005).

A partir da introdução inicial na Europa a batata dispersou pelo mundo e passou a ser vista como um bem de consumo essencial à dieta devido ao seu valor nutricional (Marks & Brodie, 1998).

O aparecimento repentino de *Phytophthora infestans*, fungo que afeta severamente os campos de cultivo de batata, levou a Irlanda e também o resto da Europa a um período de fome severa nos anos de 1845 e 1846. Após esta fase de extremas necessidades, surgiram expedições para a América do Sul à procura de novas cultivares resistentes ao fungo. Pensa-se que foi nesta altura que os NQB foram introduzidos na Europa (Marks & Brodie, 1998).

À semelhança de outros países do mundo, a batata é parte integrante da dieta dos portugueses e representa uma importante cultura em termos económicos (Cunha *et al.*, 2004). Em média por ano são cultivados 40,000 ha de batatas em Portugal (Cunha *et al.*, 2012). Em comparação com a média europeia e do Reino Unido em produtividade dos campos de cultivo, Portugal encontra-se muito abaixo dos valores das áreas acima mencionadas, este facto deve-se também à elevada taxa de infestação dos terrenos portugueses pelos NQB (Cunha *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2012).

1.10. *SOLANUM SISYMBRIIFOLIUM* – ALTERNATIVA BIOLÓGICA CONTRA OS NEMÁTODES-DE-QUISTO DA BATATEIRA

Como referido, os NQB representam uma ameaça constante contra as batateiras nas áreas onde estas são cultivadas. Uma das medidas de controlo promissora contra este problema consiste no uso de plantas armadilha, em que os exsudatos das suas raízes têm que estimular a eclosão dos J2 e inibir a sua reprodução. Segundo Scholte, (2000b,c) e Timmermans (2005) *Solanum sisymbriifolium* revelou ser uma boa planta-armadilha contra os NQB, pois os seus exsudatos radiculares promovem a eclosão dos J2 sendo resistente às duas espécies de NQB e desenvolve-se bem em climas temperados como os da Europa. É também resistente às geadas noturnas do outono, apesar de não resistir aos invernos rigorosos (Scholte, 2000b). Não sendo uma planta nativa da Europa, devem ser analisados os riscos da sua introdução na flora local. Estudos revelaram que *S. sisymbriifolium* é uma planta má ou muito pobre hospedeira dos agentes causadores de doença que afetam as Solanaceae, como tal não deve ser encarada como uma ameaça para a flora local, especialmente para a família de plantas em causa (Alconero *et al.*, 1988; Timmermans, 2005). Contudo, em algumas regiões, como por exemplo na África do Sul, *S. sisymbriifolium* é considerada infestante existindo por isso medidas implementadas para o seu controlo, pelo que a sua introdução em determinadas regiões deve ser feita após estudo prévio sobre as condições de implementação da planta no país. Em Portugal, esta espécie não existe na flora nativa (www.issg.org).

Estudos usando extratos de *S. sisymbriifolium* no combate a outras espécies de nemátodes fitoparasitas têm sido conduzidos, tais como com *Pratylenchus goodeyi* (Pestana *et al.*, 2008) e *Meloidogyne* spp (Dias *et al.*, 2012). Os extratos aquosos de *S. sisymbriifolium* mostraram-se eficazes na mortalidade de *P. goodeyi*, podendo incluir-se esta planta como adubo verde e/ou biofumigante (Pestana *et al.*, 2008). As cvs Domino, Pion, Sis 4004 e Sharp de *S. sisymbriifolium* mostraram ser resistentes a *M. chitwoodi*. Para *M. hispanica*, apenas a cv. Pion se mostrou susceptível. O efeito dos exsudatos da raiz também foi testado na eclosão destes nemátodes e mostraram ter influência na inibição da eclosão dos J2 das cinco espécies de *Meloidogyne* estudadas (Dias *et al.*, 2012).

1.10.1 ECOLOGIA

Solanum sisymbriifolium, Lamark. (Fig. 2) planta vulgarmente conhecida como “mata cavalo” (Dias *et al.*, 2012) pertence à família das Solanaceae e é nativa da América do Sul (Argentina, Brasil, Paraguai, Peru e Uruguai), mas encontra-se disseminada pelo mundo (Flier *et al.*, 2003, Karaer & Kutbay, 2007; Dias *et al.*, 2012). É uma planta anual ou perene, o seu caule e ramos são viscosos e cobertos de espinhos. A cor das flores pode variar entre a cor malva e branca. Os frutos são vermelhos quando maduros, redondos, suculentos com grande quantidade de sementes (www.issg.org), Quando o fruto ainda se encontra verde está protegido num cálice espinhoso que abre aquando o amadurecimento do mesmo (Bagalwa *et al.*, 2010). As suas raízes penetram em grandes profundidades do solo (Scholte & Vos, 2000).

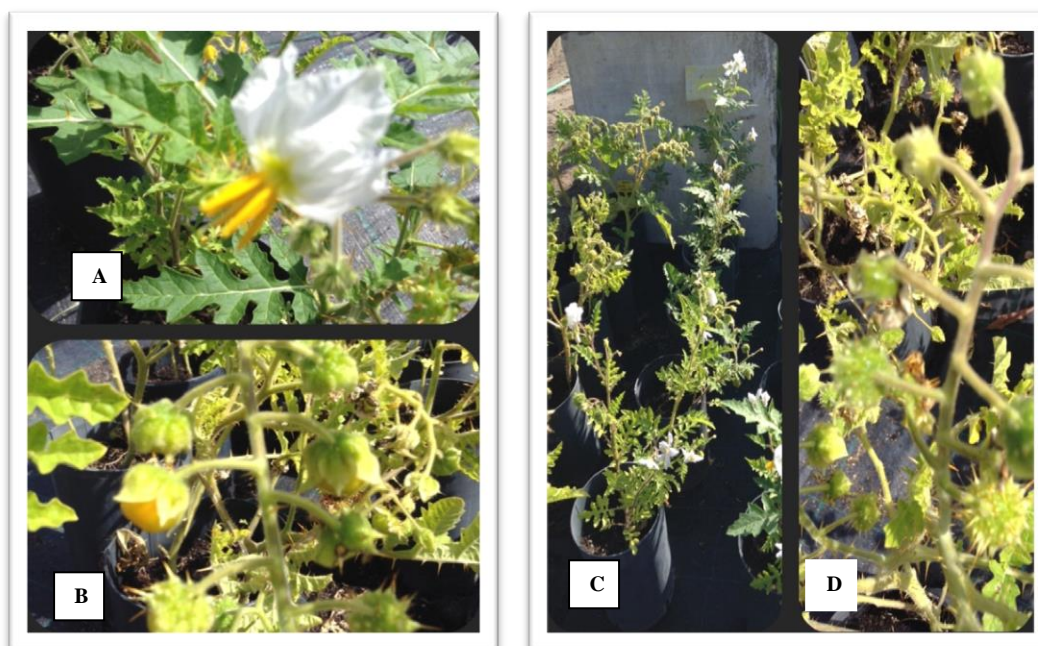


Figura 2: *Solanum sisymbriifolium*. **A:** Flor; **B e D:** Fruto envolto por um cálice espinhoso; **C:** aspeto geral da planta.

1.10.2 FITOQUÍMICOS DE SOLANUM SISYMBRIIFOLIUM

As plantas superiores são capazes de sintetizar uma grande variedade de moléculas orgânicas designadas por metabolitos secundários (Sarker *et al.*, 2005). Estes também conhecidos como fitoquímicos, intervêm no desenvolvimento e proteção da planta, mas pensa-se que não são essenciais às suas necessidades primárias (Renčo *et*

al., 2014). As plantas e os seus fitoquímicos são uma importante fonte de fármacos e biopesticidas (Renčo *et al.*, 2014). Estes compostos são também importantes na defesa das plantas contra a herbívoros. Os fitoquímicos mais importantes pertencem à classe dos alcalóides, terpenóides (mono- e diterpenóides), flavonóides, polifenóis e saponósidos (Renčo *et al.*, 2014). Aos alcalóides e saponósidos, entre outras, já foi atribuída atividade nematocida (Chitwood, 2002). Podemos encontrar estes compostos em diferentes partes da planta, como folhas, frutos ou raízes (Bagawala, 2010).

Em *S. sisymbriifolium* foram já realizados estudos farmacológicos que identificaram propriedades medicinais, moluscicidas, entre outras. Na tabela I encontra-se uma lista de compostos fitoquímicos presentes na espécie e sua atividade / uso terapêutico. É considerada uma planta medicinal tanto para humanos como para outros animais (Ibarrola *et al.*, 2000). Tradicionalmente é usada para o tratamento da hipertensão, diarreia, infeções do trato respiratório, epilepsia, depressão e também como erva abortiva (Chauhan *et al.*, 2011). O fruto de *S. sisymbriifolium* é uma fonte rica de solasodina, um glicoalcalóide venenoso comum a todas as Solanaceae.

Tabela I: Lista de compostos químicos de *Solanum sisymbriifolium*.

Composto	Zona da planta onde se encontra o composto	Atividade terapêutica	Uso	Fonte bibliográfica
Saponina esteróide: Isonuatigenina-3-O- β -solatriose	Raiz	---		Ferro <i>et al.</i> , 2005
Alcalóides esteróides: Solasodina	Fruto	Atividade convulsante; fúngica; hepatoprotetora; precursor	anti anti- de	Ferro <i>et al.</i> , 2005; Bagalwa <i>et al.</i> , 2010; Chauhan <i>et al.</i> , 2011; Dias <i>et al.</i> , 2012
Alcalóides esteróides: Solamargina	Toda a planta	---		Bagalwa <i>et al.</i> , 2010; Chauhan <i>et al.</i> , 2011;
Alcalóides esteróides: Solasonina	Toda a Planta	---		Chauhan <i>et al.</i> , 2011
Glicósido da solasodina	Toda a Planta	Tratamento tumores na pele	de	Chauhan <i>et al.</i> , 2011
Saponinas derivadas do espirostano: Nuatigenosido	Toda a Planta	Atividade moluscicida		Bagalwa <i>et al.</i> , 2010
Alcalóides esteróides: β -Solamarina	Toda a Planta	---		Bagalwa <i>et al.</i> , 2010

1.11. IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

Os NQB constituem a principal ameaça às batateiras (EPPO, 2013; Mai, 1977). Economicamente apresentam-se como um prejuízo para os agricultores, muitas vezes com valores demasiado elevados (Williamson & Hussey, 1996, Castelli *et al.*, 2005). Controlar os NQB recorrendo a produtos químicos tem vindo a ser cada vez menos recorrente devido às restrições impostas pela legislação europeia (Watts *et al.*, 2014). Surge então a necessidade de procurar e estudar alternativas biológicas amigas do ambiente, que, apesar de estarem de acordo com as leis em vigor, permitam manter níveis elevados de produção (Minnis *et al.*, 2002; Turner & Subbotin, 2013). O uso de plantas-armadilha tais como *Solanum sisymbriifolium* tem ganho importância, na medida que estimulam a eclosão dos juvenis, sem permitirem que estes completem o seu ciclo de vida (Scholte, 2000a,b,c).

Em Portugal, a batata é um dos produtos base da alimentação da população, com um consumo de 1 000 000 toneladas/ano, sendo o consumo *per capita* de 108 kg *per annum* (Cunha *et al.*, 2004). Estima-se que em média sejam cultivados 40000 ha de batateiras todos os anos (Santos *et al.*, 1995; Cunha *et al.*, 2012). No entanto, a média Portuguesa de produção de batata é muito inferior ao do resto da Europa, o que se deve em parte à presença dos NQB nos campos de cultivo (Cunha *et al.*, 2012), que em alguns casos podem chegar aos 100% (Cunha *et al.*, 2004). O nível de infestação dos campos é proporcional ao tempo em que o nemátode foi introduzido no campo e à duração dos intervalos entre culturas de batateiras (Santos *et al.*, 1995).

A espécie mais abundante em Portugal é *Globodera rostochiensis*, embora também se encontrem populações de *G. pallida* (Cunha *et al.*, 2004). Como referido, os NQB podem ser a causa da diminuição da produção de batata em Portugal, sendo por isso emergente a aplicação de medidas de controlo e diminuição das populações de nemátodes presentes no país. O uso de plantas com genes resistentes pode ser umas das alternativas, mas como já foi referenciado corre-se o perigo de diminuir o número de indivíduos de uma espécie e aumentar os indivíduos da outra, pois os genes resistentes não são aplicáveis para as duas espécies (Cunha *et al.*, 2004). O uso de nematodocidas químicos também não é uma alternativa viável, pois Portugal como estado membro da União Europeia, tem que cumprir as normas descritas na Diretiva 2007/33/EC. Surge então a necessidade de procurar uma alternativa biológica capaz de combater os NQB.

À semelhança de países como a Holanda, estão a ser desenvolvidos estudos que permitem avaliar a viabilidade de utilizar *S. sisymbriifolium* em Portugal.

O presente estudo tem como objetivo geral: Contribuir para o controlo mais amigável do ambiente e da saúde utilizando *S. sisymbriifolium* como inimigo natural dos NQB, evitando desta forma o uso de nematodocidas nos campos de cultivo. Os objetivos específicos são:

1. Testar a patogenicidade de *G. pallida* e *G. rostochiensis* em *S. sisymbriifolium*
2. Avaliar o efeito da planta nos NQB em condições de campo.
3. Avaliar os efeitos dos extratos do fruto verde de *S. sisymbriifolium* na eclosão e mortalidade de *G. pallida*.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DE EXSUDATO DE BATATEIRA, *SOLANUM TUBEROSUM* CV. DÉsirÉE

O exsudato radicular foi obtido segundo o método de Sheperd (1986). Pedacos de tubérculos com rebentos da cv susceptível, *Solanum tuberosum*, cv. Désirée, a qual não tem qualquer gene de resistência contra os NQB (Bakker *et al.*, 1993) foram colocados em vasos de plástico com orifícios na base, contendo uma mistura de areia e solo esterilizados numa proporção de 2:1. Quatro semanas após a sementeira, altura em que a produção de exsudatos radiculares é máxima (Widdowson, 1958a), os vasos com os orifícios abertos foram colocados sobre copos de vidro. Colocou-se água da torneira até o solo ficar saturado. Após começar a pingar pelos orifícios, colocaram-se 50 mL de água da torneira, deixando-se escorrer bem o lixiviado. O lixiviado recolhido foi filtrado utilizando papel de filtro Whatman nº 1 para retirar partículas de solo que tivessem sido arrastadas e foi guardado em frascos escuros a 4°C até ser utilizado num período máximo de um mês (Widdowson, 1958b).

2.2. MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *GLOBODERA PALLIDA* E *G. ROSTOCHIENSIS* EM LABORATÓRIO

Os dois isolados de NQB utilizados neste trabalho foram obtidos de amostras de solo recolhidas em dois campos de cultura de batateira localizados em Barcouço (Mealhada) e Bolho (Cantanhede). Os isolados foram mantidos e multiplicados em laboratório, utilizando como planta hospedeira a batateira, *Solanum tuberosum* cv. Désirée.

Os quistos foram colocados em água durante uma semana e após este período em exsudato (Fig. 3). Os J2 eclodidos foram contados diariamente até ter inóculo suficiente. As contagens foram feitas em placas de Doncaster (Doncaster, 1962). Fizeram-se três contagens de 1 mL. O valor usado nos cálculos do número total de J2 correspondia à média das três contagens (média das contagens x volume total = número de J2 na amostra). As plantas foram obtidas a partir de pedacos de tubérculos com rebentos, foram colocadas em recipientes de plástico com um orifício na extremidade (garrafa de água de 1,5 L cortada a meio), cheios com areia e solo esterilizados numa proporção de 2:1 e mantidas numa estufa (20-25°C, 70-75% de humidade relativa com 12h de

fotoperíodo). Várias batateiras, com o máximo de sete dias de crescimento foram inoculadas com 1800 J2/cada de cada um dos isolados. A inoculação foi feita no solo, num orifício aberto com o auxílio de uma vareta, e tapado com solo após a inoculação.

Dez semanas após a inoculação a parte aérea da planta foi removida e o solo deixado a secar. Os quistos foram extraídos usando um levigador de Fenwick (Fenwick, 1940). (Fig.4) Depois do solo seco, os quistos foram recolhidos com uma pinça, ao microscópio estereoscópico e guardados até serem utilizados.



Figura 3: Crivo com quistos de *Globodera pallida* submersos em exsudato radicular da batateira, *Solanum tuberosum* cv. Désirée



Figura 4: Levigador de Fenwick.

2.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE NEMÁTODES-DE-QUISTO DA BATATEIRA, *GLOBODERA* SPP., ATRAVÉS DE PCR – RFLP

A identificação das espécies dos nemátodes-de-quisto da batateira (NQB), *Globodera* spp., presentes nos campos de Barcouço e Bolho foi feita através de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriciton Fragment Lenght Polymorfism*, Reação em cadeia da Polimerase - Polimorfismos dos Fragmentos de ADN obtidos por enzimas de restrição).

2.3.1 EXTRAÇÃO DE ADN E AMPLIFICAÇÃO POR PCR

Procedeu-se à escolha e identificação de 5 quistos de cada população de campo. Cada um deles foi colocado individualmente numa placa de vidro escavado e deixado em água durante 1h. Seguidamente deu-se início à extração de ADN seguindo o protocolo “Purificação do ADN total em tecidos animais” do Kit QIAGEN, DNAeasy® Blood & Tissue Handbook, Julho de 2006. Após a extração do ADN das amostras realizou-se uma amplificação do ADN por PCR seguindo o protocolo de Sirca *et al.* (2010) com ligeiras modificações na temperatura de emparelhamento. O ADN foi diluído em 10 µL de tampão TE (Tris 10mM e EDTA 1mM a pH 8,0 ou 7,5). O fragmento que contém parte do gene 18S, a região ITS1, 5,8S, a região ITS2 e parte do gene 28S do ADNr foi amplificado usando os seguintes primers: CGTAACAAGGTAGCTGTAG (forward, primer 1) e TCCTCCGCTAAATGATAT (reverse, primer 2) (Ferris *et al.*, 1993). Cada tubo de PCR continha: 2,5 µL de solução tampão; 0,75 µL de MgCl₂; 1 µL de dNTP; 1,25 µL do primer 1 e primer 2; 8,05 µL de H₂O; 0,2 µL de *Taq* polimerase (Bioline); 10 µL de ADN perfazendo um volume total de 25 µL (Sirca *et al.*, 2010). A amplificação foi feita usando o termociclador BIO-RAD (Bio-Rad Laboratories, Inc) com o seguinte programa: 94°C durante 2,5 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 min, emparelhamento a 48°C durante 45 s, alongamento a 72°C durante 1 min e a extensão final a 72°C durante 2 min.

Após o PCR fez-se uma eletroforese para confirmação da amplificação. Fez-se um gel de agarose a 1% em TBE e usou-se o marcador de peso molecular de ADN Hyper Ladder TMII, Bioline, que permite quantificar e determinar o tamanho da banda (pares de bases, pb). As suas bandas mais intensas encontram-se a 300pb e a 1000pb. A

eletroforese correu a 100 mV durante 1h. As bandas foram visualizadas numa câmara de fluorescência.

2.3.2 ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Os produtos de amplificação do PCR foram incubados com as enzimas de restrição *HinfI* e *AluI* (Tabela II) a 37°C durante 3h.

Tabela II: Constituição da mistura contendo as enzimas de restrição *HinfI* e *AluI*

	<i>HinfI</i>	<i>AluI</i>
Tampão	2.5 µL	2.5 µL
H₂O	8 µL	5.5 µL
Enzima	0.5 µL	0.5 µL
Produto do PCR	4 µL	4 µL
BSA	---	2.5 µL
Volume total	15 L	15 L

A separação dos fragmentos por eletroforese foi feita num gel de agarose a 2% em (TBE) corado com *DNA Buffer Blue* (Bioline) que permitiu visualizar as bandas com luz UV.

2.4. PATOGENICIDADE DE *G. PALLIDA* E *G. ROSTOCHIENSIS* EM *S. SISYMBRIIFOLIUM* CV. MELODY, PION, SHARP, SIS 4004 E SIS 6001 EM ESTUFA

2.4.1 ESQUEMA DO ENSAIO

As plantas *Solanum sisymbriifolium* cvs Melody, Pion, Sharp, Sis 4004, Sis 6001 foram obtidas a partir de sementes cedidas pela empresa Vandijke Semo, Scheemda, Holanda. *Solanum tuberosum*, cv. Désirée, foi cedida pela Escola Agrária de Coimbra. Em Julho de 2014 foram colocadas sementes de *S. sisymbriifolium* em alvéolos que continham solo, turfa e areia esterilizados numa proporção de 1:1:1. Após três a quatro semanas as plantas apresentavam dois pares de folhas verdadeiras e foram transplantadas para vasos com 500 cm³, com igual mistura de solo, areia e turfa. Foram

feitas cinco repetições por cultivar. As plantas ficaram envasadas até Setembro. A patogenicidade de *G. pallida* e *G. rostochiensis* em *S. sisymbriifolium* foi testada inoculando as plantas com 1800 J2/vaso. *S. tuberosum* cv. Désirée foi usada como controlo para avaliar a viabilidade dos isolados de *Globodera* spp.. As plantas foram colocadas numa estufa (20-25°C, humidade relativa 70-75% com 12h de fotoperíodo). A rega foi feita diariamente. Dez semanas após a inoculação, a parte aérea das plantas foi cortada e o solo deixado a secar.

2.4.2 ANÁLISE DO SOLO

Foram levigados 500 cm³ de solo de cada talhão usando um levigador de Fenwick (Fenwick, 1940) (Fig.4). Após secagem os quistos foram retirados com uma pinça e contados ao microscópio estereoscópico.

2.5. CONTAGEM DOS JOVENS DO SEGUNDO ESTÁDIO (J2) SEGUNDO A METODOLOGIA DE SHEPERD (1986).

Para cada amostra selecionaram-se aleatoriamente 50 quistos, que foram colocados numa placa de vidro escavado contendo 1 ml de água da torneira durante 24h. Após esse período os quistos foram transferidos, com o auxílio de um pincel, para uma superfície de metal ligeiramente côncava e esmagados com um cilindro de vidro. Colocaram-se os quistos esmagados numa proveta com 50 ml de água que foi agitada com uma palheta de borracha acoplada a um agitador elétrico para libertar os J2 e os ovos que ainda estivessem no interior dos quistos. Finalizado este processo, colocou-se 1mL da suspensão para uma placa de Doncaster (Doncaster, 1962), efetuando-se a contagem de J2 e ovos com o auxílio de um microscópico estereoscópico. Este processo foi feito três vezes. O valor usado nos cálculos do número total de J2 correspondeu à média das três contagens (média das contagens x volume total = número de J2 em 50 quistos). Quando o nº de quistos foi inferior a 50 e superior a 20 ajustou-se o volume ao nº de quistos. Quando inferior a 20 não se efetuou a contagem.

Com base no número de quistos e de J2 por quisto foi calculada a população final (Pf). Com o valor obtido, calculou-se a viabilidade da população, comparando a população inicial (Pi=1800 J2/vaso) com a Pf.

2.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE SOLANUM SISYMBRIIFOLIUM EM GLOBODERA PALLIDA E G. ROSTOCHIENSIS -ENSAIOS DE CAMPO

O efeito de *S. sisymbriifolium* sobre os NQB num esquema de rotação de culturas com batateira foi avaliado em ensaios de campo.

2.6.1 ESQUEMA DO ENSAIO

As plantas de *Solanum sisymbriifolium* cvs Melody, Pion, Sharp, Sis 4004, Sis 6001 foram obtidas a partir de sementes cedidas pela empresa Vandijke Semo, Scheemda, Holanda. *Solanum tuberosum*, cv. Désirée foi cedida pela Escola Agrária de Coimbra.

Os campos de Bolho (Cantanhede) e Barcouço (Mealhada) (fig. 5 e 6) foram escolhidos anteriormente no âmbito do projeto PTDC/AGR-AAM/101817/2008. Os ensaios tiveram início em 2012.

Foram avaliadas as características físico-químicas do solo, tais como a percentagem de matéria orgânica e pH.



Figura 5: Campo agrícola situado em Bolho (Cantanhede)



Figura 6: Campo agrícola situado em Barcouço (Mealhada)

Dividiu-se os terrenos em 21 talhões (três réplicas para cada cultivar), cada um deles com 5 m², que se mantiveram ao longo de toda a duração do ensaio. Na tabela III, está representado o esquema do ensaio enquanto na tabela IV se encontram os parâmetros dos talhões onde as cultivares de *S. sisymbriifolium* foram semeadas. As plantas foram monitorizadas regularmente. Após três meses as batatas foram colhidas em ambos os campos e o rendimento da colheita (número e tamanho dos tubérculos) foi determinado. Os tubérculos de *S. tuberosum* cv. Désirée foram caracterizados e para isso escolheu-se aleatoriamente dez tubérculos em cada um dos campos e seguindo estes critérios: cor do tubérculo fresco, tamanho, forma, olhos e percentagem de matéria seca (%MS). No caso de *S. sisymbriifolium*, no final de 6 meses as plantas foram cortadas, destruídas e incorporadas no solo. Durante a floração as flores foram cortadas e destruídas para evitar a produção de fruto e sementes com a consequente propagação da

planta. Foram realizados dois controlos, um controlo positivo com plantação de batata e sem planta e um controlo negativo sem cultura durante todo o ensaio.

Antes e após cada cultura, foram recolhidas amostras de solo aleatoriamente em cada talhão e foram analisadas quanto à presença de quistos. Na tabela V encontra-se descrita a cronologia dos acontecimentos desde o ano inicial 2012, até ao presente ano.

Durante o decorrer do ensaio no dia em que as batateiras foram plantadas, o solo dos dois terrenos foi fertilizado (133Kg de N (azoto); 133 Kg de P_2O_5 (pentóxido de fósforo); 133 Kg de K_2O (óxido de potássio)). Em Maio de 2012 e 2013 foi colocado adubo (225 Kg de N) e foram feitos tratamentos contra as infestantes e tratamentos fitossanitários contra o míldio e escaravelhos.

Tabela III: Esquema dos talhões no campo de Bolho e Barcouço

A3	A2	A1
B3	B2	B1
C3	C2	C1
D3	D2	D1
E3	E2	E1
F3	F2	F1
G3	G2	G1

Nome do talhão	Posição do talhão
B/Melody	A3, C1, E2
B/Pion	B1, F2, G3
B/Sharp	A2, D3, F1
B/Sis 6004	B2, D1, F3
B/Sis 6001	C3, D2, G1
B/N	B3, E1, G2
N/N	A1, C2, E3

Melody, Pion, Sharp, Sis 4004 e Sis 6001 cultivares de *S. sisymbriifolium* usadas no ensaio; **B/N**: Batata/Nada (controlo positivo); **N/N**: Nada/Nada (controlo negativo)

21 Talhões com 5 m² cada

Tabela IV: Parâmetros dos talhões onde as cultivares de *Solanum sisymbriifolium* foram semeados nos campos de Bolho e Barcouço

Parâmetro	Bolho e Barcouço
Densidade de sementes (sementes/m ²)	400
Número de linhas	13
Comprimento das linhas (m)	3,03
Distância entre as linhas (cm)	12,70
Distância dentro da linha (cm)	1,97

Tabela V: Cronologia dos acontecimentos nos anos 2012 a 2015 nos campos de Bolho e Barcouço

Espécie de <i>Solanum</i>	Sementeira				Colheita / Destruição			
	2012	2013	2014*	2015*	2012	2013	2014*	2015*
<i>S. tuberosum</i>	Mar	Abr	Abr		Jul	Jul	Jul	
<i>S. sisymbriifolium</i>	Jul	Set		Jun	Jan	Mar		Dez

*Apenas no campo de Barcouço

2.6.2 ANÁLISE DO SOLO

Foram levigados 500 cm³ de solo de cada talhão usando um levigador de Fenwick (Fenwick, 1940) (Fig.4). Após secagem os quistos foram retirados com uma pinça e contados ao microscópio estereoscópico. Para a análise dos resultados, fez-se a divisão de forma a obter os dados por cada 100 cm³.

2.6.3 CONTAGEM DOS JOVENS DO SEGUNDO ESTÁDIO (J2) SEGUNDO A METODOLOGIA DE SHEPERD (1986).

Metodologia descrita no ponto 2.4.3.

2.6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos foram analisados estatisticamente com recurso a uma análise de variância (ANOVA) usando o programa StaSoft Inc. (2011), STATISTICA (sistema de análise de dados), versão 10.

2.7. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DO FRUTO VERDE DE *SOLANUM SISYMBRIIFOLIUM* CV. MELODY E SIS 6001

As sementes de *S. sisymbriifolium*, cvs Melody e Sis 6001, foram obtidas a partir de sementes cedidas pela empresa Vandijke Semo, Scheemda, Holanda.

Com o objetivo de obter frutos verdes de *S. sisymbriifolium* em grande quantidade, foram colocadas sementes a germinar em alvéolos nos terrenos anexos da Escola Superior Agrária de Coimbra. Quando as plantas apresentavam dois pares de folhas verdadeiras foram transplantadas para vasos de grandes dimensões. As regas foram feitas diariamente tal como a monitorização. Quando começaram a surgir os primeiros frutos, os mesmos foram colhidos antes de amadurecerem. Após cada colheita, os frutos foram postos em sacos de congelação devidamente identificados e colocados a -20°C. Desta forma manteve-se a integridade do fruto e impediu-se o amadurecimento do mesmo.

2.7.1 DETERMINAÇÃO DO PESO SECO DO FRUTO VERDE

Devido ao elevado teor de água dos frutos e aos diferentes estádios do seu desenvolvimento, determinou-se, para cada cv, a média do peso seco para uma amostragem de três frutos com um tamanho diferente e representativo da amostra. Os frutos foram colocados numa estufa a 105°C durante 24h, após o que se procedeu a aquecimentos de 1h na estufa, até se obter peso constante (Tabela VI).

Tabela VI: Fórmulas de cálculo dos parâmetros usados para determinar o peso seco do fruto verde de *Solanum sisymbriifolium*

Peso fresco da amostra	$PF = (T+A) - T$
Peso seco da amostra	$PS = PC - T$
% de peso seco	$PF \text{ ----- } PS$ $100g \text{ ----- } x$

T: tara do recipiente onde se coloca a amostra; **A:** amostra; **PC:** valor correspondente ao peso constante entre duas pesagens; **PF:** peso fresco; **PS:** peso seco

2.7.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Prepararam-se extratos aquosos, por decocção, partindo dos frutos frescos.

A massa do fruto fresco de *S. sisymbriifolium* a usar no processo extrativo foi calculada com base no respetivo peso seco, de forma a obter, em peso fresco, a massa correspondente a 6 g de peso seco.

O fruto de cada uma das cvs foi pesado ainda congelado e colocado num frasco de vidro com 150 ml de água destilada. Trituraram-se os mesmos usando um homogeneizador Ultra Turrax. Após este processo, transferiu-se o homogeneizado para um balão de Erlenmeyer adicionando mais água destilada até perfazer um volume correspondente à proporção massa de amostra / volume de água de 1:10. A extração decorreu num banho de água fervente, sob refluxo e durante uma hora (Fig.7).

A relação massa de fruto fresco / volume de solvente extrativo (água) utilizados para cada amostra encontra-se na tabela VII.

Tabela VII: Relação massa de fruto fresco / volume de solvente extrativo usados para cada uma das cultivares (Melody e Sis 6001) de *Solanum sisymbriifolium*

	Melody	Sis 6001
Fruto fresco (g)	50,433 (± 50g)	40,936 (± 41g)
Volume de água (mL)	500	400



Figura 7: Obtenção do extrato do fruto de *Solanum sisymbriifolium* por decocção.

Após a extração, arrefeceram-se os extratos à temperatura ambiente e as amostras foram filtradas sob vácuo usando um funil de Büchner acoplado a um sistema de vácuo. Os extratos filtrados foram posteriormente concentrados, a baixa temperatura (<40°C) e a pressão reduzida, por recurso a um evaporador rotativo, constituído pelo banho, Buchi B480; Bomba de vácuo, Buchi V700; Rotador, Buchi R114 e pelo refrigerador (Minichiller), Huber, que está ligado a todo o sistema (Fig.8).



Figura 8: Concentração de uma amostra num evaporador rotativo

A seguir à concentração os extratos foram congelados e liofilizados. Após a pesagem dos liofilizados, o que permitiu avaliar o rendimento do processo extrativo, os extratos secos foram guardados em frascos hermeticamente fechados, e mantidos a -20°C.

2.8. TESTES DE ECLOSÃO

Para a realização deste ensaio usaram-se 1400 quistos de *Globodera pallida* que foram colocados em placas de cultura de 24 poços, com água da torneira, durante 6 dias. Após este período foram retirados da água e colocados 20 quistos por cada bloco de vidro escavado. A cada um destes blocos foi adicionado 1 ml dos extratos do fruto verde de *Solanum sisymbriifolium*, cvs Melody e Sis 6001, respetivamente, nas 5 concentrações a analisar. Foram feitas cinco repetições para cada um dos tratamentos. Começou por se fazer uma solução aquosa (solução *stock*) de concentração 0,4 mg/ml (8 mg de extrato para um volume final de 20 mL). A partir desta solução foram realizadas quatro diluições, como esquematizado na figura 9.

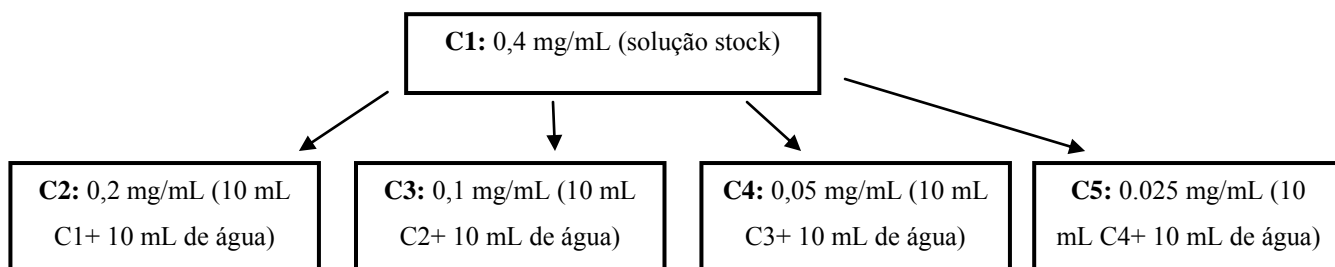


Figura 9: Esquematização das diluições de cada uma das cultivares (Melody e Sis 6001) de *Solanum sisymbriifolium* usadas no ensaio realizadas a partir da solução *stock*.

Foi feita a contagem do número de J2 eclodidos, recorrendo ao microscópio estereoscópico. Esta contagem foi iniciada 24h após a exposição dos quistos aos extratos e repetida de 24h em 24h até ao máximo de 30 dias. Os J2 eclodidos foram sendo retirados do bloco de vidro, ao longo das sucessivas contagens. O exsudato da raiz da batateira cv. Désirée foi usado como controlo positivo e a água usada como controlo negativo. Este ensaio decorreu no escuro, numa câmara húmida, à temperatura

de $22 \pm 2^\circ \text{C}$. No final foi determinada a percentagem de eclosão cumulativa (%EC) que foi convertida em valores de inibição da eclosão (IE) que é dada pela seguinte fórmula:

$$\mathbf{IE} = 100 - E$$

Em que **IE** = inibição da eclosão cumulativa (%); **E** = eclosão cumulativa (%).

Estes valores foram depois corrigidos segundo a fórmula de Abbott (1925):

$$\mathbf{Ic} = (I_E - I_T) \times 100 / (100 - I_T)$$

Em que **I_C** = inibição da eclosão cumulativa corrigida (%); **I_E** = Inibição da eclosão cumulativa no extrato (%); **I_T** = Inibição da eclosão cumulativa no controlo (%)

Os J2 e ovos dentro dos quistos foram contabilizados no fim do ensaio seguindo a metodologia descrita no ponto 2.4.3.

2.8.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos foram analisados estatisticamente com recurso a uma análise de variância (ANOVA) usando o programa StaSoft Inc. (2011), STATISTICA (sistema de análise de dados), versão 10.

2.9. TESTE DE MORTALIDADE

Para a realização deste ensaio foram utilizados 100 quistos de *Globodera pallida*. Estes foram colocados em água da torneira, durante 6 dias. Após este período foram retirados da água e colocados em exsudato da raiz da batateira cv. Désirée. No dia seguinte foram retirados os J2 eclodidos, e colocados 15 J2/bloco de vidro escavado. A concentração de extrato do fruto verde de *S. sisymbriifolium* cvs Melody e Sis 6001 testada na mortalidade foi a de 0,05 mg/mL, que corresponde aquela que apresentou melhores resultados nos testes de eclosão dos J2. A água foi usada como controlo. Foram feitas três repetições. As observações, feitas ao microscópio estereoscópico, começaram 6h após a montagem do ensaio. Seguiram-se observações após 12, 24 e 72h. Este ensaio decorreu no escuro, numa câmara húmida à temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$.

Os J2 móveis foram considerados vivos. Quanto aos J2 imóveis, foram transferidos para um bloco de vidro escavado com água e observados durante algum tempo, e caso se mantivessem imóveis eram transferidos para um novo bloco com 100

μL de água aos quais se adicionaram 100 μL de NaOH (hidróxido de sódio) 1M. Se os J2 estivessem vivos o NaOH iria destruir a sua membrana celular fazendo com que os J2 se mexessem. Caso não se observasse movimento, concluir-se-ia que os J2 estariam mortos (Chen & Dickson, 2000).

2.9.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos foram analisados estatisticamente com recurso a uma análise de variância (ANOVA) usando o programa StaSoft Inc. (2011), STATISTICA (sistema de análise de dados), versão 10.

2.10. CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA, TLC (*THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY – CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA*): PESQUISA DE FITOQUÍMICOS NO FRUTO VERDE DE *S. SISYMBRIIFOLIUM*

A TLC (Fig. 10) é um processo de separação cromatográfica no qual a fase estacionária é uma fina camada colocada sobre um suporte sólido (Hahn-Deinstrop, 2007). A separação dos constituintes das amostras ocorre por eluição da fase móvel, que devido à ação de capilaridade, arrasta consigo os compostos para os quais tem mais afinidade. Cada composto interage de forma diferente com a fase estacionária e a fase móvel, apresentando assim um comportamento particular (Vermeris & Nicholson, 2006), expresso pelo respetivo fator de retenção (Rf), que é definido como o quociente entre a distância percorrida por um determinado composto e a distância percorrida pelo solvente (Hahn-Deinstrop, 2007). Na tabela VIII, estão identificadas as fases estacionárias e móveis que foram usadas neste trabalho.

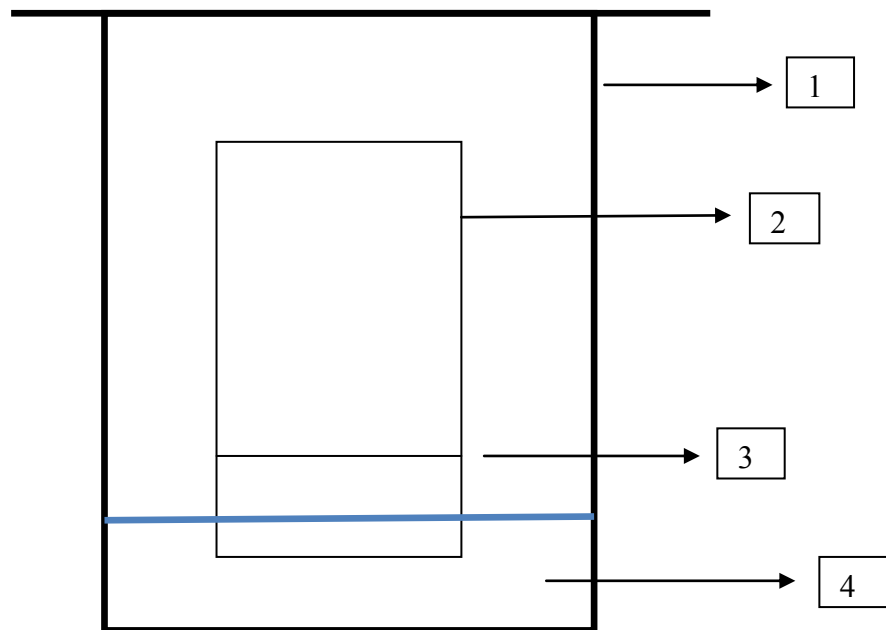


Figura 10: Esquematização da TLC (*Thin Layer Chromatography* - Cromatografia em camada fina)
1: Câmara cromatográfica; **2:** Placa de sílica; **3:** Ponto de aplicação das amostras; **4:** Fase móvel.

No presente trabalho e de acordo com as pesquisas bibliográficas referidas na introdução, os principais metabolitos secundários presentes nas Solanaceas em geral e em *Solanum sisymbriifolium* em particular pertencem às famílias dos saponósidos e alcalóides esteróides (Tabela VIII).

Tabela VIII: Eluentes e fase estacionária usados na aquisição dos perfis cromatográficos para os extratos de *Solanum sisymbriifolium*

Família de compostos	Fase estacionária	Eluente	Fonte bibliográfica
Saponósidos	Placa de sílica com indicador de fluorescência a 254 nm	Clorofórmio-metanol-água de (65:50:10)	Wagner & Bladt, 1996
Alcalóides	Placa de sílica com indicador de fluorescência a 254 nm	Tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10) Acetona-água-concentrado de amónia (90:7:3) n-hexano-acetato de etilo (1:1) Clorofórmio-metanol-água (70:30:5)	Wagner & Bladt, 1996 Wagner & Bladt, 1996 Hunter <i>et al.</i> , 1976 Bagalwa <i>et al.</i> , 2010

2.10.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E DOS REVELADORES

Os extratos liofilizados do fruto verde das cvs cultivares Melody e Sis 6001 de *Solanum sisymbriifolium* (4 a 5 mg) foram dissolvidos em 1 mL de metanol a 30% e identificados, nas placas cromatográficas com as letras A – Sis 6001 e B – Melody. Foram aplicados com o auxílio de uma micro seringa, 15 µL de cada solução, a 1 cm da base da placa. Deixou-se correr o eluente numa câmara saturada do mesmo, protegida da luz, até este atingir a linha de frente. Retirou-se a placa da câmara e deixou-se evaporar o eluente à temperatura ambiente. Observou-se a placa à luz visível e, de seguida, com o auxílio de luz ultravioleta a 254 nm. Na figura 11 está esquematizada a placa de sílica e as marcações.

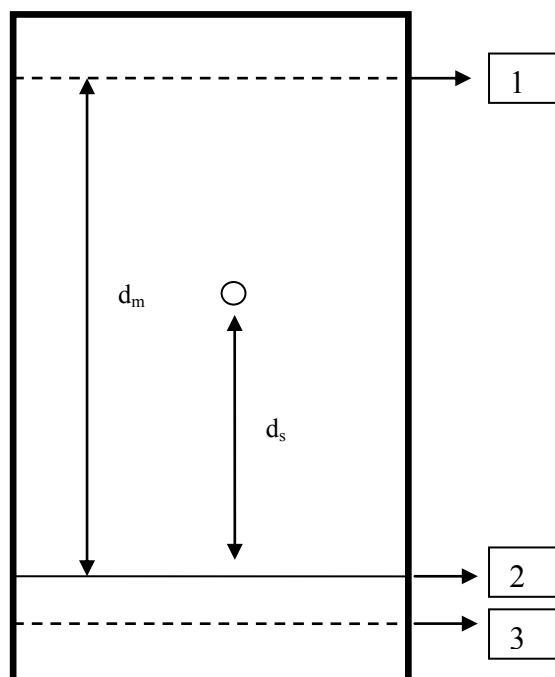


Figura 11: Esquematização da placa de sílica. **1:** Linha de frente da fase móvel; **2:** Ponto de aplicação da amostra; **3:** Nível a que deve ficar a fase móvel na câmara cromatográfica; **d_m :** distância percorrida pela fase móvel; **d_s :** Distância percorrida pelo composto.

Seguidamente procedeu-se à pesquisa/deteção dos fitoconstituintes em estudo, submetendo-se a placa aos reagentes de revelação. Os reveladores são agentes específicos que, pela sua constituição química permitem identificar famílias de compostos. Como referido anteriormente, nos presentes extratos pretendeu-se verificar a presença de saponósidos e alcalóides (Tabela IX).

Tabela IX: Reveladores para saponósitos e alcalóides: constituição, aplicação e resultados esperados

Compostos	Revelador	Aplicação	Resultados esperados	Fonte bibliográfica
Saponósidos	Vanilina com ácido sulfúrico	Vaporização em spray e aquecimento a 110°C	Aparecimento de manchas nos tons de verde e violeta	Wagner & Bladt, 1996
Alcalóides	Dragendorff com ácido tartárico	Vaporização em spray	Aparecimento de manchas acastanhadas	Wagner & Bladt, 1996
	Ácido sulfúrico a 50%	Vaporização em spray e aquecimento a 100°C	Aparecimento de manchas acastanhadas	Hunter <i>et al.</i> , 1976; Ibarrola <i>et al.</i> , 2000; Bagalwa <i>et al.</i> , 2010



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE NEMÁTODES-DE-QUISTO DA BATATEIRA, *GLOBODERA* SPP., ATRAVÉS DE PCR – RFLP

A identificação morfológica das espécies mostra-se muitas vezes imprecisa além de ser morosa (Stone, 1985; Shields *et al.*, 1996) requerendo também técnicos muito experientes. Existem características-chave tais como a região perineal do quisto e o estilete dos jovens do segundo estágio (J2) que podem variar dentro das populações e serem muito semelhantes entre espécies o que pode levar a uma identificação incorreta (Fleming & Powers, 1998). Falhas na caracterização e identificação de espécies com grande impacto económico como é o caso dos nemátodes-de-quisto da batateira (NQB), *Globodera* spp., podem levar a uma incorreta implementação de medidas de controlo. Como tal, a identificação molecular é um processo complementar à identificação morfológica e morfométrica e também um processo mais rápido (Abrantes *et al.*, 2004) e eficiente.

Para confirmar a identificação dos isolados usados nos ensaios recorreu-se à técnica de PCR - RFLP que é um método molecular usado para identificar as espécies de *G. pallida*, *G. rostochiensis* e *G. tabacum* (Thiery & Mugniery, 1996; Fleming *et al.*, 2000; Skantar *et al.*, 2007). O resultado obtido após PCR que permitiu amplificar o ADN mostrou que os primers usados seguindo a metodologia de Ferris *et al.* (1993), foram os corretos. Todos os quistos utilizados pertenciam ao género *Globodera*. Os fragmentos de ADNr ITS resultantes tinham aproximadamente 1000pb de comprimento, (Fig. 12). Para Gp1, GrA, GrB não houve amplificação que poderá dever-se a erros na extração do ADN ou aos quistos escolhidos encontrarem-se vazios ou com poucos J2.

Os perfis de RFLP são diferentes para cada uma das espécies do género *Globodera* (Sirca *et al.*, 2010) gerando fragmentos de ADN com diferentes comprimentos (Tabela X).

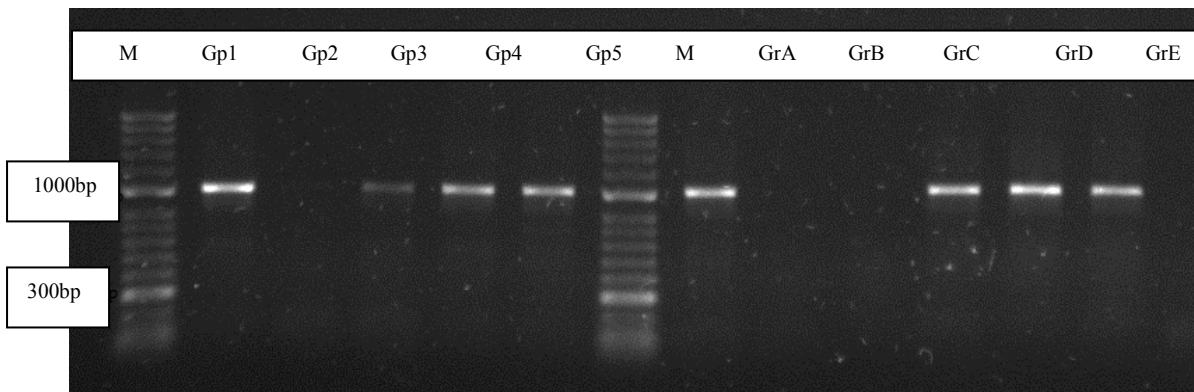


Figura 12: Amplificação dos fragmentos de ADN_r ITS **Gp1-Gp5:** *Globodera pallida*; **GrA-GrE:** *G. rostochiensis*; +: controlo positivo; -: controlo negativo; **M:** Hyper LadderTMII

Tabela X: Tamanho dos fragmentos de ADN_r amplificados e comprimento dos fragmentos após digestão com as enzimas de restrição *AluI* e *HinfI* para as duas espécies: *Globodera pallida* e *G. rostochiensis* (Sirca et al., 2010)

Espécie	Tamanho do fragmento	do <i>AluI</i>	<i>HinfI</i>
<i>G. rostochiensis</i>	1002	381, 359, 148, 100, 14	921, 81
<i>G. pallida</i>	1002	520, 382, 100	769, 152, 81

Na figura 13, estão os resultados obtidos após digestão dos fragmentos com as enzimas de restrição.

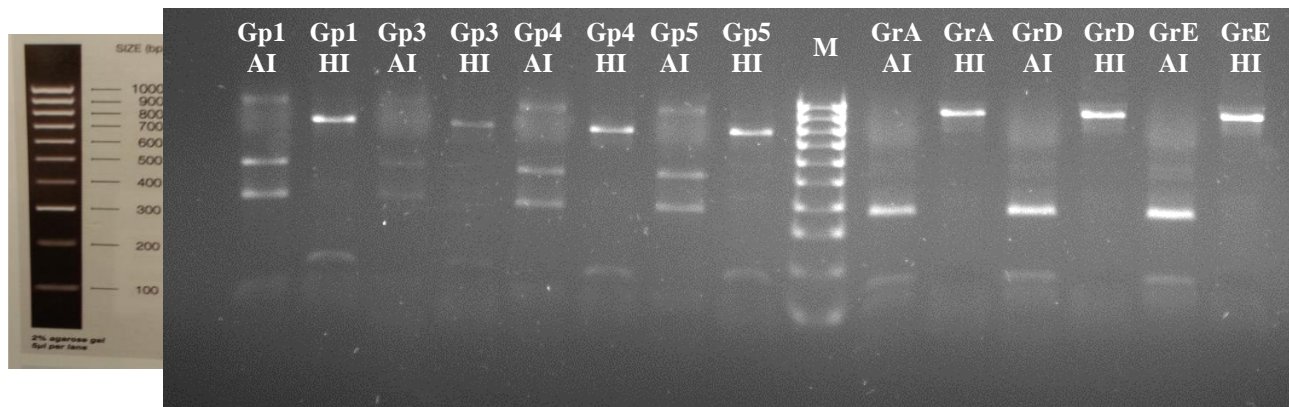


Figura 13: Caracterização molecular dos isolados/populações de *Globodera* usando as enzimas de restrição *AluI* e *HinfI*. **Gp1-Gp5:** *G. pallida*; **GrA-GrE:** *G. rostochiensis*; **M:** Hyper LadderTMII.

As enzimas de restrição *HinfI* e *AluI* permitem fazer a distinção entre *G. pallida* e *G. rostochiensis* (Sirca et al., 2010). Sendo que *AluI* é específica para *G. rostochiensis* e *HinfI* é específica para *G. pallida*. Os quistos provenientes do campo de Bolho

pertencem à espécie *G. pallida* enquanto os quistos provenientes de Barcouço pertencem à espécie *G. rostochiensis* tal como havia sido identificado anteriormente (Conceição, comunicação pessoal).

3.2. PATOGENICIDADE DE *GLOBODERA PALLIDA* E *G. ROSTOCHIENSIS* EM *S. SISYMBRIIFOLIUM* CVS MELODY, PION, SHARP, SIS 4004 E SIS 6001 EM ESTUFA

O tempo e as condições em que decorreu o ensaio, 10 semanas, com temperatura, humidade e fotoperíodo controlados (20-25°C, humidade relativa 70-75% com 12h de fotoperíodo) provaram ser adequadas para o desenvolvimento e reprodução dos nemátodes. Em nenhuma das espécies de NQB ocorreu reprodução nas cvs de *S. sisymbriifolium* (Tabelas XI e XII).

Os valores do número de quistos (NQ) e população final (Pf) em *S. tuberosum* cv. Désirée confirmaram a viabilidade do inoculo para *G. pallida*. As populações finais (Pf) resultantes são dez vezes superiores à população inicial (Pi), de 1800 J2/vaso (McKenzie & Turner, 1987).

No ensaio com *G. rostochiensis*, a Pf em *S. tuberosum* não foi muito elevada. Para duas das réplicas não se verificou que a Pf fosse 10 vezes superior à Pi, não sendo desta forma consideradas válidas (McKenzie & Turner, 1987). Tal pode dever-se ao facto de a batateira ter sido inoculada já um pouco tarde. As batateiras estavam no limite dos 7 dias pois o inóculo suficiente foi difícil de obter. Uma outra hipótese deve-se a que os J2, em alguns dos casos, já não estarem viáveis pois foram sendo recolhidos e guardados a 4°C até se obter os 1800 J2 necessários.

Tabela XI: Patogenicidade de *Globodera pallida* em *Solanum sisymbriifolium*

Espécie	Cultivar	NQ*	Pi (J2/mL)	Pf (J2/mL)*
<i>S. sisymbriifolium</i>	Melody	0	1800	0
	Pion	0	1800	0
	Sharp	0	1800	0
	Sis 4004	0	1800	0
	Sis 6001	0	1800	0
<i>S. tuberosum</i>	Désirée	56±12	1800	195070±60966

NQ: número de quistos; **Pi:** população inicial; **Pf:** população final; * valor médio das 5 réplicas ± erro padrão

Tabela XII: Patogenicidade de *Globodera rostochiensis* em *Solanum sisymbriifolium*

Espécie	Cultivar	NQ*	Pi (J2/mL)	Pf (J2/mL)*
<i>S. sisymbriifolium</i>	Melody	0	1800	0
	Pion	0	1800	0
	Sharp	0	1800	0
	Sis 4004	0	1800	0
	Sis 6001	0	1800	0
<i>S. tuberosum</i>	Désirée	192±26	1800	23294±4216

NQ: número de quistos; **Pi:** população inicial; **Pf:** população final; * valor médio das 3 réplicas ± erro padrão

Os presentes resultados demonstram que *S. sisymbriifolium* tem potencial para ser usada como arma biológica contra os NQB. Todas as cvs de *S. sisymbriifolium* são resistentes às duas espécies de NQB, como tal podem ser incluídos nos programas de rotações de culturas no combate aos mesmos. Os resultados estão de acordo com os obtidos por Scholte (2000c).

Os mesmos ensaios de patogenicidade foram feitos com cinco espécies do género *Meloidogyne* (*M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. hapla*, *M. hispanica* e *M. javanica*)

e quatro cvs de *S. sisymbriifolium* (Domino, Pion, Sharp e Sis 4004). Os resultados obtidos mostram que as cvs de *S. sisymbriifolium* não sendo totalmente resistentes aos isolados de *Meloidogyne* em estudo, podem ser integradas num programa de controlo dos mesmos pois mantêm a densidade populacional baixa, e desta forma diminui o impacto económico causado pelos nemátodes (Dias *et al.*, 2012). Pestana *et al.*, (2008) demonstraram o efeito nematodocida de extratos da parte aérea e raiz de *S. sisymbriifolium* contra *Pratylenchus goodeyi*. Desta forma, evidencia-se a potencialidade de *S. sisymbriifolium* vir a ser usada como planta armadilha na luta biológica contra nemátodes fitoparasitas que mais impacto têm na economia.

Não obstante os resultados terem sido obtidos em condições controladas, os testes de patogenicidade devem ser feitos com as populações do local onde se pretende implementar o programa pois existe grande variabilidade fisiológica e ambiental tanto nas plantas como nos nemátodes que podem modificar a resposta das cvs ao nemátode.

3.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE *S. SISYMBRIIFOLIUM* EM *G. PALLIDA* E *G. ROSTOCHIENSIS* -ENSAIOS DE CAMPO

Foram escolhidos dois campos: Barcouço (Mealhada), infestado com *G. rostochiensis* e Bolho (Cantanhede), infestado com *G. pallida*. A escolha foi baseada no elevado número de quistos presentes e na facilidade de acesso aos campos. A identificação das espécies de NQB foi feita por PCR-RFLP, descrita no ponto 3.1. O ensaio teve início no ano de 2012. Os resultados dos parâmetros da análise do solo estão na tabela XIII:

Tabela XIII: Análise físico-química dos solos de Bolho e Barcouço (2012)

Parâmetro	Bolho	Barcouço
Matéria orgânica (%)	2,07	4,08
pH	± 6	4,7

Na tabela XIV apresentam-se os resultados da caracterização dos tubérculos colhidos nos campos de Barcouço e Bolho nos ensaios em 2012 e 2013.

Tabela XIV: Caracterização dos tubérculos de *S. tuberosum* cv. Désirée colhidos nos campos de Bolho e Barcouço nos ensaios de campo (valores médios de 10 exemplares)

Campo	Cor*	Tamanho (cm)*	Forma*	Olhos (nº)*	Matéria seca (%)*	
					2012	2013
Barcouço	Amarelo	6,5	Oval	1,5	22,04	21,78
Bolho	pálido		alongado		21,54	19,82

*Valores médios de 10 exemplares

Scholte (2000c) comparou o efeito na diminuição do peso da raiz de *Solanum sisymbriifolium* para dois valores de pH (6 e 4,8) e relacionou-os com a diminuição da eclosão dos NQB. Embora o peso da raiz tenha diminuído nos solos com pH=6 esta diminuição não afeta a eclosão dos NQB. Os valores de pH dos campos escolhidos estão dentro desses parâmetros, sendo que não será este fator a condicionar o crescimento de *S. sisymbriifolium* nem a eclosão dos NQB.

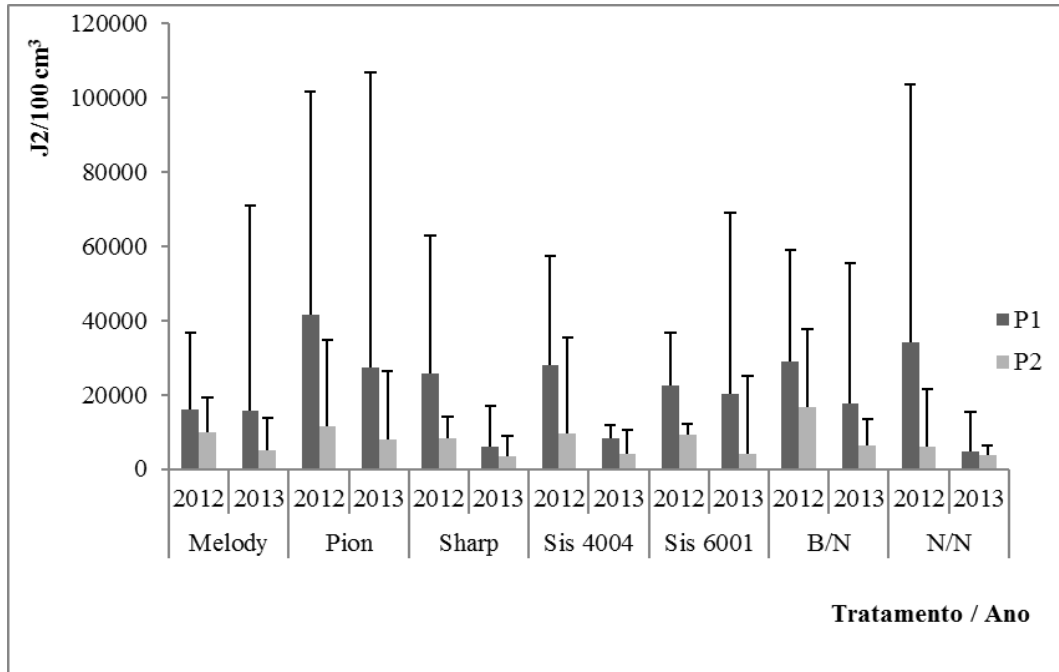
Numa fase inicial as plantas suscetíveis conseguem tolerar a invasão dos NQB sem afetar o seu desenvolvimento e rendimento (Marks & Brodie, 2008), isto pode explicar o facto de ao longo dos dois anos os tubérculos manterem as mesmas características. O nível de infestação poderá também não ser tão elevado ao ponto dos estragos serem aviltados.

O resultado da análise do solo no campo de Bolho e de Barcouço nos dois anos do ensaio quanto ao número de J2/100 cm³ de cada talhão com os respetivos tratamentos (Fig. 14) é apresentado usando a média das três repetições. Após análise estatística através da ANOVA fatorial e teste LSD (Fishers Least Significant Difference) verificou-se que não existem diferenças significativas entre talhões nem entre os dois anos do tratamento. Os resultados foram expressos em J2/100cm³, como o observado nas diferentes literaturas consultadas, e não pelo número de quistos. Isto acontece porque os quistos das populações de campo variam muito quanto ao tamanho e número de ovos por quisto. A variação aumenta quando o campo é sujeito a adubos e pesticidas químicos, como foi o caso dos dois campos escolhidos (Been & Schomaker, 2001).

Nos dois campos em 2012 nos talhões N/N, isto é, sem *S. tuberosum* nem *S. sisymbriifolium*, foram semeadas batatas. Uma vez que em Barcouço há vários anos que não eram semeadas batatas tentou-se aumentar a população em todo o campo para que os efeitos fossem mais notórios. Para que nos dois campos os ensaios seguissem os

mesmos critérios procedeu-se do mesmo modo no Bolho Após retirar as batatas estes talhões nunca mais foram semeados.

A



B

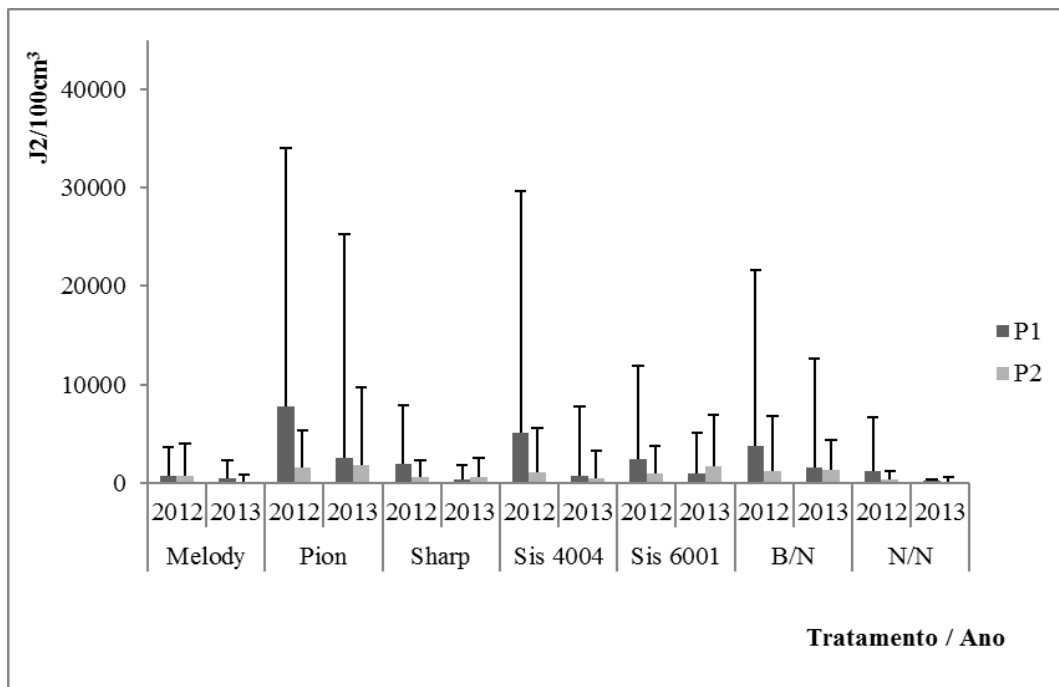


Figura 14: Número de J2/100cm³ de *G. pallida* no campo do Bolho (**A**) e *G. rostochiensis* no campo de Barcouço (**B**). **P1:** população de nemátodes após colheita de *Solanum tuberosum*; **P2:** população de nemátodes após *Solanum sisymbriifolium*; Melody, Pion, Sharp, Sis 4004 e Sis 6001 - cultivares de *S. sisymbriifolium* em estudo. **B/N:** Batatas/Nada; **N/N:** Nada/Nada estes talhões foram usados como controlo do ensaio. Os valores são médias de três repetições ± erro padrão.

Em 2012 no campo do Bolho, verificou-se em todos os tratamentos que o número de J2/100cm³ da P2, população de nemátodes após *S. sisymbriifolium*, é sempre inferior à P1, população de nemátodes após *S. tuberosum*, cv. Désirée, espécie susceptível aos NQB. Embora essas diferenças não sejam estatisticamente significativas. A análise dos erros padrão mostra a existência de grandes diferenças entre réplicas. Tal pode ser explicado por erros de amostragem dentro dos talhões ou mesmo contaminações de uns talhões para os outros.

No talhão correspondente ao controlo B/N, onde não se cultivou *S. sisymbriifolium* após colheita de *S. tuberosum* verificou-se uma diminuição do número de J2/100cm³, esta será uma diminuição natural na medida que esse talhão esteve em pousio durante o tempo, cerca de 6 meses, em que *S. sisymbriifolium* esteve nos outros talhões.

Nos talhões que não levaram *S. tuberosum* nem *S. sisymbriifolium* verificou-se a existência de um número elevado de J2/100cm³, que como foi referido se deve ao facto de ter sido colocada batata nesses talhões no 1º ano. Sabe-se que no campo do Bolho, *S. tuberosum* sempre foi a cultura principal durante muitos anos, como tal, a densidade populacional dos nemátodes sempre foi elevada.

Em 2013 nos talhões correspondentes ao N/N, nada foi cultivado, estando em pousio durante todo o ensaio. O número de J2/100cm³ é assim bastante reduzido quando comparado com o ano anterior.

Verificou-se o mesmo comportamento que em 2012 em todos os tratamentos, contudo pode-se verificar, ainda que não seja estatisticamente significativo, que *S. sisymbriifolium* ajudou a que não houvesse um aumento do número de J2/100cm³ em relação ao primeiro ano. Em todos os tratamentos, as P1 são inferiores às P1 correspondentes ao ano de 2012. Exceto para a cv Pion ainda que estatisticamente não seja significativo, o valor médio de J2/100cm³ é semelhante ao talhão em que nada foi cultivado, estando assim os valores obtidos semelhantes ao talhão que esteve em pousio durante todo o ensaio.

Em 2012 a quantidade de plantas de *S. sisymbriifolium* por talhão no campo do Bolho foi inferior, provavelmente devido às condições ambientais. As sementes de *S. sisymbriifolium* germinaram em pequena quantidade pois as temperaturas nesse ano foram muito elevadas e as regas não foram regulares. Em 2013 pelo contrário, observou-se germinação das plantas, existindo mais de 100 plantas em alguns dos talhões.

No campo de Barcouço no ano de 2012 verificou-se que o número de J2/100cm³ da P2 é inferior ao número de J2/100cm³ da P1, sendo esse comportamento mais acentuado nas cvs Pion e Sis 4004.

Em 2013, as primeiras chuvas aliadas às regas fizeram com que as infestantes começassem a crescer e a competir com as cvs de *S. sisymbriifolium*, pois têm um crescimento muito mais rápido. O número de plantas de *S. sisymbriifolium*, por talhão, foi assim mais baixo do que o esperado. O ensaio está a ser repetido neste momento não tendo sido ainda obtidos valores para completar o estudo. Este facto pode explicar os resultados obtidos para as cvs Sharp e Sis 6001, em que a densidade de J2/100cm³ não diminuiu após o tratamento com *S. sisymbriifolium*.

As diferenças verificadas entre os dois campos quanto ao número de J2/100cm³ podem ser explicadas pelo facto de em Barcouço, a batata não ser a cultura principal. O campo tem sido usado para outras culturas ou não foi mesmo utilizado durante alguns anos. Sendo isto responsável pela diminuição do número de J2/100cm³ viáveis e assim da densidade populacional inicial. Os quistos também se encontravam danificados e os ovos continham fungos como *Pochonia chlamydosporia* (Vieira dos Santos, comunicação pessoal) inimigo natural de *Globodera* spp. Tobin *et al.*, (2008) demonstraram que este fungo pode ser usado como agente de controlo biológico contra os NQB em condições ambientais do Reino Unido. No campo de Bolho, a batata é a cultura principal há vários anos, o que faz com que a densidade populacional do nemátode seja elevada e os quistos sejam novos e saudáveis.

Um aspeto a ter em conta é altura do ano em que se semeia *S. sisymbriifolium*. A Holanda tal como Portugal tem um clima temperado. Extrapolando os resultados obtidos na Holanda, a época do ano ideal para a sementeira encontra-se entre o início de Maio e o fim de Julho, pois é neste intervalo de tempo que as probabilidades de ocorrerem problemas com a cultura (crescimento e desenvolvimento) são mais baixas (Timmermans, 2005). Em 2012 as sementes de *S. sisymbriifolium* foram semeadas em Julho, contudo em 2013, devido às batatas terem sido colhidas mais tarde e para evitar as altas temperaturas verificadas em Agosto, já foram semeadas em Setembro. Estas datas estendem-se aos dois campos em estudo. Os referidos ensaios foram levados a cabo com a mesma densidade de sementes por metro quadrado (400 sementes/m²) que nos ensaios desenvolvidos na Holanda.

3.4. EXTRATOS DO FRUTO VERDE DE *SOLANUM SISYMBRIIFOLIUM* CV. MELODY E SIS 6001

A identificação de fitoconstituintes presentes nos extratos do fruto verde (com maior atividade biológica) de *S. sisymbriifolium* é essencial para perceber qual dos compostos ou mistura de compostos têm efeito nematodocida.

Em ensaios anteriores ao testar o efeito dos exsudatos radiculares das cultivares de *S. sisymbriifolium* na eclosão dos NQB, as cvs Melody e Sis 6001 foram as que apresentaram melhores resultados. Devido a isto, foram estas as cvs usadas nos estudos dos extratos do fruto verde de *S. sisymbriifolium* (Conceição, comunicação pessoal).

Solanum sisymbriifolium é uma planta que não se encontra naturalmente na flora Portuguesa. Na África do Sul, por exemplo, *S. sisymbriifolium* é considerada infestante existindo por isso medidas implementadas para o seu controlo, pelo que a sua introdução nos países afetados pelos NQB deve ser feita após estudo prévio sobre as condições de implementação da planta no país (www.issg.org). Usar os fitoconstituintes da planta como bionematodocida em vez da planta no seu todo é assim uma vantagem, pois pode deixar de ser necessário semear a mesma evitando-se a sua propagação.

3.4.1 DETERMINAÇÃO DO PESO SECO DO FRUTO VERDE DE *SOLANUM SISYMBRIIFOLIUM*

O fruto verde de *S. sisymbriifolium* é essencialmente constituído por água. Cujo teor pode variar, entre outros fatores, consoante o peso, estado de maturação e tamanho do fruto. Assim, exprimindo os resultados em peso seco diminui-se o erro associado à variação do teor de água na amostra. Na tabela XV encontra-se o peso fresco e seco tal como a percentagem do peso seco do fruto verde (Tabela XVI).

Tabela XV: Determinação do peso seco do fruto verde de *Solanum sisymbriifolium* para as cultivares Melody e Sis 6001

	Cultivar	
	Melody	Sis 6001
Peso fresco da amostra (g)*	1,2265	1,1439
Peso seco da amostra (g)*	0,1658	0,1970
Peso seco (%)*	13,5	17,2

*valor médio de 3 exemplares

3.4.2 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO EXTRATIVO DO FRUTO VERDE

O peso seco do extrato obtido a partir do fruto verde de *S. sisymbriifolium* cvs Melody e Sis 6001 encontra-se referido na tabela XVI. Este permitiu avaliar o rendimento do processo extrativo (Tabela. XVI).

Tabela XVI: Peso do fruto fresco e do extrato (liofilizado) obtido para cada cultivar de *S. sisymbriifolium* e rendimento extrativo

Cultivar	Peso fresco (g)	Peso do liofilizado (g)	Rendimento extrativo (%)
Melody	50,443	2,2957	4,6
Sis 6001	40,936	1,7529	4,3

3.5. TESTES DE ECLOSÃO DE *GLOBODERA PALLIDA*

Os ensaios de eclosão foram feitos apenas com *G. pallida* que não sendo a espécie de NQB dominante em Portugal é a mais difícil de controlar, pois os meios usados para diminuir estes fitoparasitas tendem a ser pouco eficientes contra *G. pallida* (Cunha *et al.*, 2004). Pela análise da figura 15, os extratos do fruto verde de *S. sisymbriifolium* cv. Sis 6001 apresentam uma inibição da eclosão cumulativa corrigida dos J2 de *G. pallida* de 2,7% para a concentração de 0,05 mg/mL, sendo que para as restantes concentrações em estudo os valores são muito semelhantes ainda que

ligeiramente mais baixos. Na cv. Melody (Fig.16) a inibição cumulativa corrigida é residual não tendo significado.

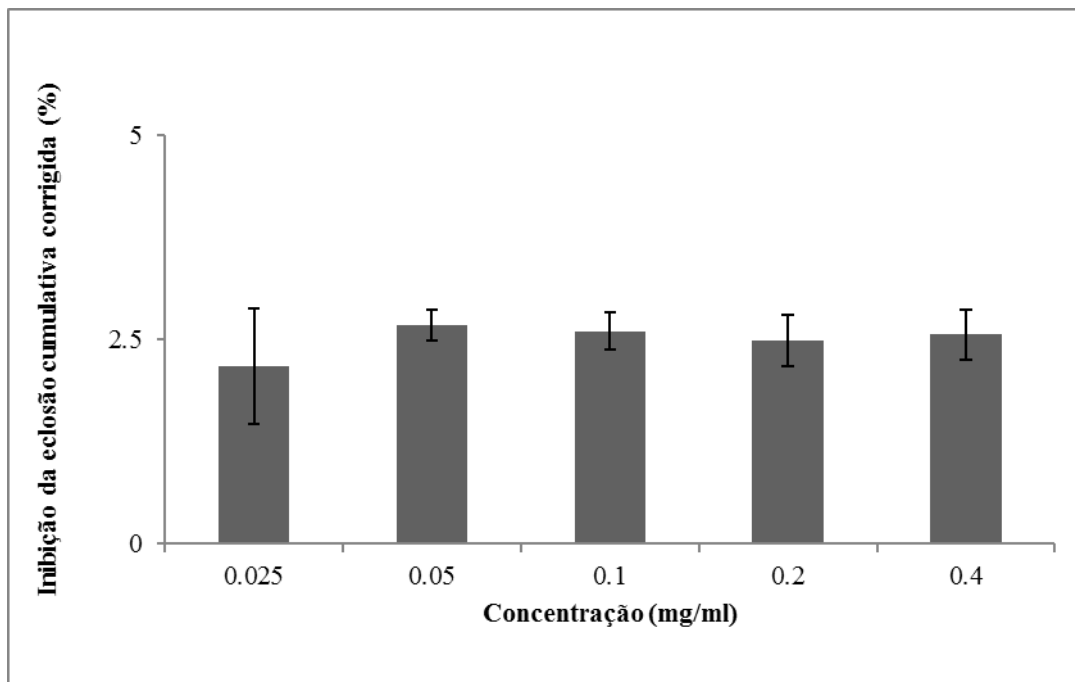


Figura 15: Inibição da eclosão cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925) com os respectivos erros padrão para o extrato de fruto verde de *Solanum sisymbriifolim* cv. Sis6001.

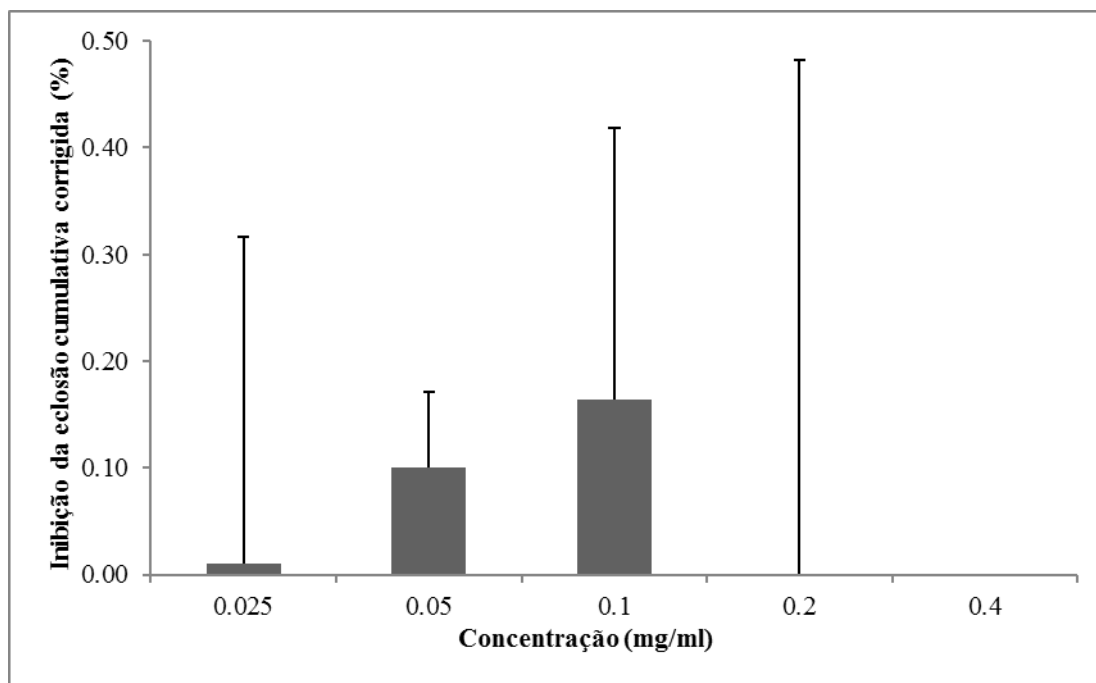


Figura 16: Inibição da eclosão cumulativa corrigida pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925) com os respectivos erros padrão para o extrato de fruto verde de *Solanum sisymbriifolim* cv. Melody.

Os valores baixos de eclosão cumulativa corrigida no controlo (*S. tuberosum*, cv. Désirée), 24,74% para o ensaio com a cv Melody e 2,96% para o ensaio com a cv Sis 6001, podem estar relacionados com a diapausa dos J2. A diapausa é um fenómeno fisiológico caracterizado por uma reduzida taxa de eclosão de alguns J2, mesmo na presença de exsudatos radiculares das plantas hospedeiras (Marks & Brodie, 1998; Scholte & Vos, 2000). As diferenças entre cada cultivar e dentro dos tratamentos efetuados não foram significativas.

3.6. TESTES DE MORTALIDADE DE *GLOBODERA PALLIDA*

A concentração usada nos ensaios de mortalidade, 0,05 mg/mL, corresponde àquela com melhores resultados na inibição cumulativa corrigida da eclosão dos J2, no entanto, os extratos de fruto verde de *S. sisymbriifolium* cvs Melody e Sis 6001 na concentração estudada não tiveram qualquer efeito na mortalidade dos J2 de *G. pallida*. Devem testar-se as restantes concentrações, e comparar os resultados. Podem também testar-se concentrações mais elevadas.

Apesar de os extratos não terem efeitos relevantes na inibição da eclosão dos J2 e não terem afetado a sua mortalidade, os mesmos podem afetar a sua viabilidade. Para tal, devem ser realizados testes de viabilidade em que se coloquem os J2 em contacto com os extratos nas concentrações a testar durante um determinado período de tempo e depois inocular plantas suscetíveis com esses J2.

Pestana *et al.*, (2008) testaram o efeito de diferentes concentrações (250 mg/mL; 25 mg/mL e 12,5 mg/mL) de extratos da raiz e parte aérea e mistura dos dois da cv. Pion de *S. sisymbriifolium* e *S. nigrum* na mortalidade de *Pratylenchus goodeyi*. A concentração de 250 mg/mL de extrato contendo uma mistura da raiz e da parte aérea de *S. sisymbriifolium* foi a que apresentou maior efeito na mortalidade deste nemátode. A mortalidade de *P. goodeyi* em *S. nigrum* foi ligeiramente afetada. O que leva a supor que as concentrações do extrato do fruto verde de *S. sisymbriifolium* testadas nos presentes ensaios foram muito baixas, podendo a partir destes dados testarem-se novas concentrações e verificar o seu efeito em *Globodera* spp. Contudo, especial atenção deve ser dada à toxicidade dos mesmos para outros elementos biológicos (plantas e animais) presentes no solo.

3.7. TLC: FITOQUÍMICOS DO FRUTO VERDE DE *SOLANUM SISYMBRIIFOLIUM* CV. MELODY E SIS 6001

3.7.1 OBSERVAÇÃO NA CÂMARA DOS ULTRA-VIOLETA (UV)

Após a secagem da placa de sílica eluída com clorofórmio-metanol-água (65:50:10), procedeu-se à sua observação aos UV para verificar o comportamento cromatográfico dos constituintes presentes nas amostras (Fig. 17).

Registou-se uma separação dos vários fitoconstituintes, que, devido à sua diferente natureza química, demonstraram um diverso comportamento cromatográfico, que pode ser expresso pelos respetivos fatores de retenção, R_f .

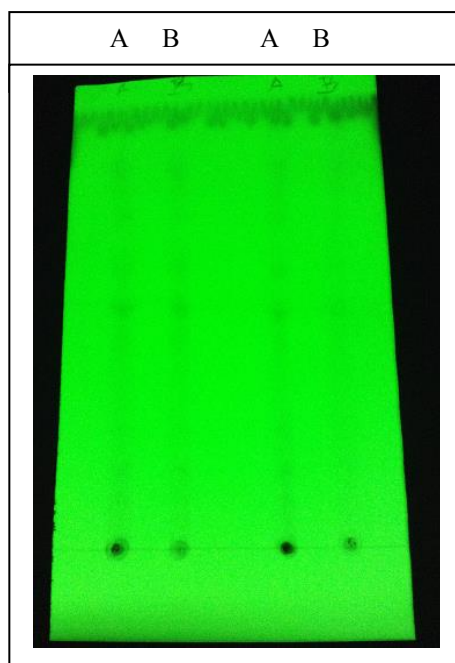


Figura 17: Cromatograma dos extratos observado aos UV. Em que **A** representa a amostra da cultivar Sis 6001 e **B** amostra da cultivar Melody, no eluente clorofórmio-metanol-água (65:50:10)

3.7.2 APLICAÇÃO DOS REVELADORES

Esta mesma placa foi, depois de observada aos UV, sujeita à ação de dois diferentes reveladores.

Numa parte da placa aplicou-se o revelador vanilina com ácido sulfúrico seguido de aquecimento a 110°C. Tanto na cv. Sis 6001 como em Melody foi detetada a presença de saponósidos (Fig. 18).

Os parâmetros para o cálculo do fator de retenção foram medidos e o mesmo calculado.

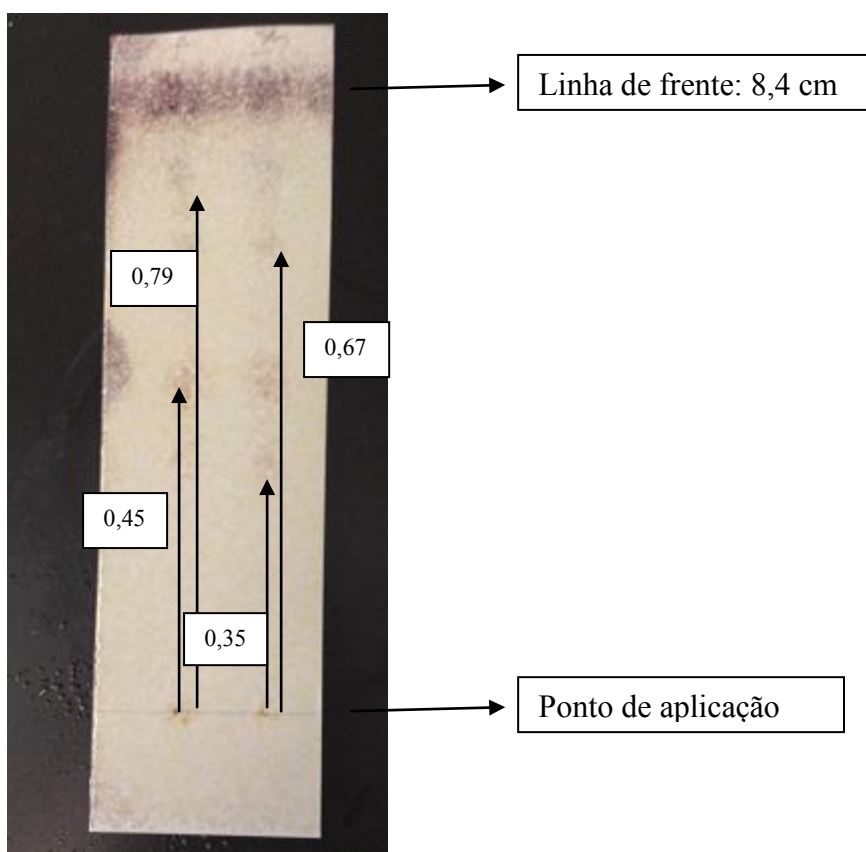


Figura 18: Perfil cromatográfico obtido por TLC (*Thin Layer Chromatography* – Cromatografia em camada fina) em placa de sílica GF₂₅₄ desenvolvida com clorofórmio-metanol-água (65:50:10), após revelação com vanilina e ácido sulfúrico, com o registo dos respetivos valores de R_f.

O revelador Dragendorff com ácido tartárico, usado para identificar alcalóides, não se mostrou eficaz. Para verificar se a limitação se relacionava com a incapacidade separativa do eluente, repetiu-se a cromatografia com uma nova fase móvel: tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10). Contudo esta também não se revelou eficaz na subsequente deteção dos alcalóides, após aplicação do revelador. Com base na informação de Wagner & Bladt, (1996), recorreu-se a outra fase móvel indicada para a

separação de alcalóides: acetona-água-amónia concentrada (90:7:3). Contudo o sistema eluente/revelador utilizado também não permitiu detetar alcalóides.

Segundo Chauhan *et al.* (2011) e Bagalwa *et al.* (2010), os alcalóides presentes em *S. sisymbriifolium* são do tipo esteróide, assim os eluentes e revelador usados, apesar de se destinarem a alcalóides das Solanaceas, podem não pôr em evidência os alcalóides particulares da espécie em estudo.

Curiosamente, estes resultados foram coincidentes com os de Ibarrola *et al.* (2000), que também constataram que o tipo de alcalóides presentes nesta espécie não são detetados pelo revelador Dragendorff, podendo este facto dever-se à natureza esteróide dos alcalóides presentes no fruto verde das duas cvs de *S. sisymbriifolium*. Tendo por base esta premissa recorreu-se ao revelador proposto por Bagalwa *et al.*, (2010); Ibarrola *et al.* (2000); Hunter *et al.* (1976), ácido sulfúrico a 50% com subsequente aquecimento a 100°C, após a separação cromatográfica com clorofórmio-metanol-água (70:30:5), de acordo com Bagalwa *et al.* (2010). (Fig. 19).

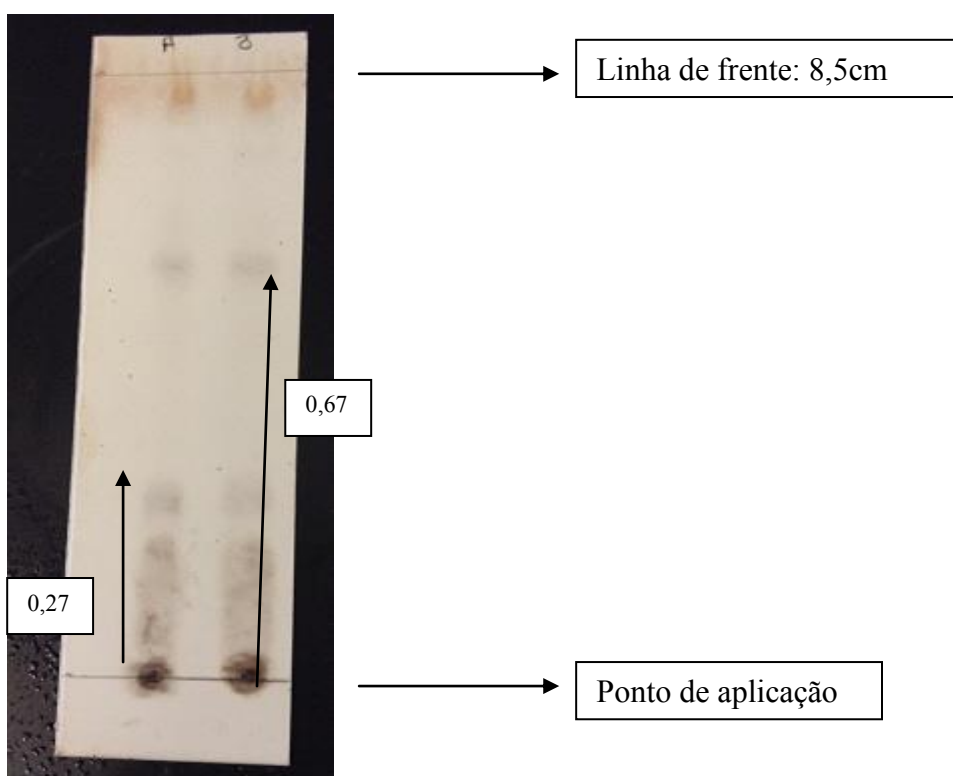


Figura 19: Perfil cromatográfico obtido por TLC (*Thin Layer Chromatography* – Cromatografia em camada fina) em placa de sílica GF₂₅₄ desenvolvida com o eluente clorofórmio-metanol-água (70:30:5) e revelação pelo ácido sulfúrico a 50 %, com o registo dos respetivos valores de R_f.

A comparação com dados bibliográficos sugere, pelo valor do respetivo fator de retenção, que o composto com $R_f = 0,27$ pode corresponder ao alcalóide esteróide solamargina (Fig. 20), que é referenciado como tendo atividade biológica contra moluscos aquáticos (caracóis) e pode ser usada como moluscicida em programas de controlo contra estas espécies (Silva *et al.*, 2005; Bagalwa *et al.*, 2010).

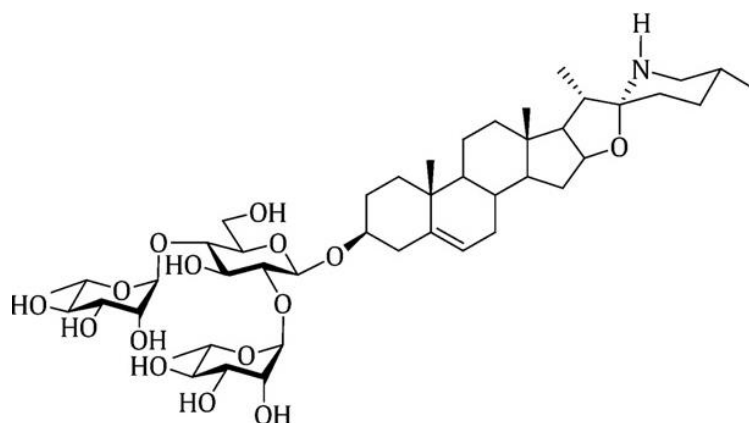


Figura 20: Estrutura da solamargina (Bagalwa *et al.*, 2010).

A deteção dos alcalóides foi obtida não só com um revelador mas também com um eluente semelhante àqueles usados para os saponósidos. Para confirmar que os resultados obtidos não correspondiam a falsos positivos realizou-se nova TLC usando o eluente clorofórmio-metanol-água (70:30:5), o mesmo a que se recorreu para a análise dos alcalóides, mas recorrendo à vanilina, revelador dos saponósidos. Após a TLC e aplicação do revelador, mediram-se os R_f para este sistema cromatográfico. Os valores obtidos estão indicados na Tabela XVII.

Tabela XVII: Valores do R_f para o extrato de fruto verde de *S. sisymbriifolium* usando o eluente clorofórmio-metanol-água (70:30:5)

R_f1	0,63
R_f2	0,71
R_f3	0,68
R_f4	0,96

Comparando estes valores de R_f com os das manchas detetadas pelo ácido sulfúrico a 50%, verificou-se que o alcalóide eventualmente correspondente à solamargina ($R_f = 0,27$) não poderá corresponder a nenhum dos fitoconstituintes que se deduziu serem saponósidos.

Relativamente ao composto com $R_f = 0,67$ igualmente detetado pelo ácido sulfúrico a 50%, não se pode inferir o grupo químico (alcalóide ou saponósido), mas apenas a sua natureza esteróide.



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A agricultura é uma das principais atividades mundiais e que mais área ocupa na superfície terrestre. As culturas são sucessivamente ameaçadas por múltiplos inimigos que, ao desenvolverem-se, influenciam negativamente as colheitas, trazendo dificuldades económicas e sociais.

Ao longo do tempo os melhoramentos agrícolas foram evidentes, a introdução de maquinaria na agricultura veio permitir a massificação da produção. Produtos químicos usados na luta contra as pragas agrícolas ganharam relevância nos últimos 50 anos (Lambert & Bekal, 2002), contudo, o uso exagerado destes produtos trouxe consequências graves para a biodiversidade, para a saúde ambiental e dos seres vivos.

Com as restrições impostas pela legislação europeia, houve uma inversão deste tipo de agricultura e passou a ser mais valorizada uma agricultura assente num desenvolvimento sustentável. Estratégias de controlo alternativas tendo como base a sustentabilidade devem ser desenvolvidas. Deve reduzir-se a utilização de substâncias ativas nocivas, nomeadamente através da substituição das mais perigosas por outras mais seguras e amigas do ambiente (Diretiva 2009/128/CE).

Os nemátodes-de-quisto da batateira (NQB) junto com outros nemátodes fitoparasitas fazem parte do grupo de ameaças constantes, causando enormes danos nas culturas em todo o mundo (Dias *et al.*, 2012; Renčo *et al.*, 2014). O seu controlo é essencial para evitar perdas económicas e sociais mais graves.

Várias são as opções para o controlo dos NQB não sendo nenhuma 100% eficaz. É no uso combinado de opções que está a eficiência e posterior redução do número de indivíduos de uma população (Atkins *et al.*, 2003; Tobin *et al.*, 2008).

Solanum sisymbriifolium é uma planta-armadilha que promove a eclosão dos jovens do segundo estágio (J2) sendo resistente às duas espécies de NQB, impedindo deste modo a continuação do seu ciclo de vida (Scholte, 2000b,c). Tal é evidenciado nos resultados obtidos nos ensaios de laboratório do presente trabalho. As cvs em estudo mostraram ser resistentes aos NQB, podendo ser consideradas como uma alternativa biológica na luta contra estes e outros nemátodes fitoparasitas. Em países como a Holanda têm sido desenvolvidos estudos sobre a introdução de *S. sisymbriifolium* na flora local e o uso da mesma como planta-armadilha contra os NQB (Scholte, 2000a,b,c; Timmermans, 2005). Uma vez conhecidas e bem definidas as interações entre as cultivares de *S. sisymbriifolium* e os NQB é possível usar esta informação de forma a fazer escolhas eficazes para a redução populacional destes nemátodes em solos infestados.

Estudos semelhantes foram desenvolvidos em Coimbra, Portugal. Estes mostraram que *S. sisymbriifolium* cresce bem na região. Tais resultados podem ser extrapolados para as restantes regiões do país. Em Portugal, a batata é uma importante cultura em termos económicos e sociais e que enfrenta o problema dos NQB. *Globodera rostochiensis* é a espécie dominante no país, contudo é *G. pallida* a espécie mais difícil de controlar, devido à elevada variedade em termos de virulência (Cunha *et al.*, 2004). Por este motivo, os ensaios desenvolvidos com os extratos do fruto verde de *S. sisymbriifolium* foram feitos com esta espécie de NQB, sendo necessário continuar e aprofundar os estudos também com *G. rostochiensis*.

As plantas e os seus fitoquímicos naturais são uma importante fonte de fármacos e biopesticidas (Renčo *et al.*, 2014). Pode-se aproveitar o seu potencial na luta contra os nemátodes fitoparasitas, uma vez que aos alcalóides e saponósidos já foi atribuída atividade nematodocida (Chitwood, 2002) e à solamargina, alcalóide presente no fruto verde, também já foi atribuída atividade moluscicida (Bagawala, 2010). Podemos encontrar estes compostos em diferentes partes da planta, como folhas, frutos ou raízes (Bagawala, 2010). Como tal, a identificação dos fitoquímicos de *S. sisymbriifolium* é uma vertente de combate na luta contra os NQB, pois tendo esse conhecimento é possível conceber bionematodocidas sem ter o problema da introdução da planta na flora local. No presente trabalho, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações dos extratos do fruto verde de *S. sisymbriifolium* na eclosão e na mortalidade dos NQB e posteriormente feita a análise cromatográfica dos extratos. As principais famílias de compostos encontrados pertencem aos alcalóides e saponósidos, ambos de natureza esteróide. Os extratos do fruto verde de *S. sisymbriifolium* cv. Sis 6001 inibem, ainda que muito pouco a eclosão dos J2. Contudo, esses valores não são significativos.

O estudo dos fitoquímicos presentes no fruto verde de *S. sisymbriifolium* deve continuar e a partir daí desenvolver-se novos produtos capazes de diminuir as densidades populacionais dos NQB. Os resultados obtidos são promissores quanto ao uso dos extratos do fruto verde. Contudo, no decorrer do ensaio tornou-se evidente que seria melhor testar concentrações mais elevadas. Também outros métodos extrativos devem ser testados e verificada a sua atividade na eclosão, mortalidade e viabilidade dos nemátodes.

A necessidade de desenvolver alternativas biológicas contra estes fitoparasitas é crucial para o desenvolvimento dos países, especialmente os países subdesenvolvidos, em que a falta de recursos económicos impede a implementação de outras estratégias.

Por outro lado, nos países desenvolvidos as restrições impostas pelas leis impedem o uso de produtos químicos, emergindo assim a necessidade de criar alternativas eficazes e amigas do ambiente (Roberts, 1992).



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265-267.
- Abrantes, I. M. de O.; Vieira dos Santos, C., M.; Conceição, I. L. P. M. da; Cunha, M.J. & Santos, M. S. (2004). Biochemical and molecular characterization of plant-parasitic nematodes. *Phytopathology Mediterranea*, 43, 232-258.
- Abreu, C. A. G. & Santos, M. S. N. de A. (1989). *Nemátodos-de-quisto da batateira: Biologia, distribuição, meios de luta e avaliação de prejuízos*. Coimbra: Instituto de Zoologia, Universidade de Coimbra.
- Alconero, R.; Robinson, R. W.; Dicklow, B. & Shail, J. (1988). *Verticillium* wilt resistance in eggplant, related *Solanum* species, and interspecific hybrids. *HortScience*, 23, 388-390.
- Atkins, S. D., Clark, I. M.; Sosnowska, D.; Hirsch, P. R. & Kerry, B. R. (2003). Detection and quantification of *Plectosphaerella cucumerina*, a potential biological control agent of potato cyst nematodes, by using conventional PCR, real-time PCR, selective media, and baiting. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4788-4793.
- Bagalwa, J. M. M; Nazabadioko, L. V.; Sayagh, C. & Bashwira, A. S. (2010). Evaluation of the biological activity of the molluscicidal fraction of *Solanum sisymbriifolium* against non target organisms. *Fitoterapia*, 81, 767-771.
- Bakker, J.; Folkertsma, R. T.; Rouppe Van Der Voort; J. N. A. M.; De Boer, J. M. & Gommers, F. J. (1993). Changing concepts and molecular approaches in management of virulence genes in potato cyst nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 169-190.
- Been, T. H. & Schomaker, C. H. (2001). Ways to improve the accuracy of hatching tests for *Globodera* spp. with special emphasis on nematicide trials. *Nematology*, 3, 773-795.
- Bulman, S. R. & Marshall, J. W. (1997). Differentiation of Australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 25, 123-129.
- Carta, L. K. & Handoo, Z. A. (2005). Guidelines for isolation and identification of regulated nematodes of potato (*Solanum sisymbriifolium* L.) in North America. *Revista Mexicana de Fitopatologia*, 23, 211-221.
- Castelli, L.; Bryan, G.; Blok, V. C.; Ramsay, G. & Phillips, M. S. (2005). Life stage responses observed amongst fifteen wild *Solanum* species resistant to *Globodera pallida*. *Nematology*, 7, 701-711.

- Chauhan, K.; Sheth, N.; Ranpariya, V. & Parmar, S. (2011). Anticonvulsant activity of solasodine isolated from *Solanum sisymbriifolium* fruits in rodents. *Pharmaceutical Biology*, 49, 194-199.
- Chen, S. Y. & Dickson, D. W. (2000). A Technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera* glycines. *Journal of Nematology*, 32, 117–121.
- Chitwood, D. J. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 221-249.
- Cunha, M. J. M. da; Conceição, I. L. P. M. da; Abrantes I. M. de O. & Santos, M. S. N. de A. (2012). Virulence assessment of Portuguese isolates of potato cyst nematodes (*Globodera* spp.). *Phytopathologia Mediterranea*, 51, 51-68.
- Cunha, M. J. M. da; Conceição, I. L. P. M. da; Abrantes, I. M. de O.; Evans, K. & Santos, M. S. N. de A. (2004). Characterization of potato cyst nematode populations from Portugal. *Nematology*, 6, 55-58.
- Dias, M.; Conceição, I. L. P. M. da; Abrantes, I. M. de O. & Cunha, M. J. M. da (2012). *Solanum sisymbriifolium* – a new approach for the management of plant-parasitic nematodes. *European Journal of Plant Pathology*, 133, 171-179.
- Diretiva Europeia 2007/33/EC de 11 de Junho de 2007. Jornal Oficial da União Europeia L 156/s3. União Europeia. Bruxelas.
- Diretiva Europeia 2009/128/CE de 21 de Outubro de 2009. Jornal Oficial da União Europeia. L 309/71. União Europeia, Bruxelas.
- Doncaster, C. C. (1962). A counting dish for nematodes. *Nematologica*, 7, 334-337.
- EPPO. (2013). *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *European and Mediterranean Plant Protection Organization*, 119-138.
- Fenwick, D. W. (1940). Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. *Journal of Helminthology*, 18, 155-172.
- Ferris, V. R.; Ferris, J. M. & Faghihi, J. (1993). Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes. *Fundamental and Applied Nematology*, 2, 177-184.
- Ferro, E. A.; Alvarenga, N. L.; Ibarrola, D. A.; Hellión-Ibarrola, M. C. & Ravelo, A. G. (2005). A new steroidal saponin from *Solanum sisymbriifolium* roots. *Fitoterapia*, 76, 577-597.

- Fleming C. C. & Powers, T. O. (1998). Potato cyst nematode diagnostics: morphology, differential hosts and biochemical techniques. In: R.J. Marks, B.B. Brodie, (eds.) *Potato Cyst Nematode: Biology, Distribution and Control* (91-114). Wallingford: CAB international.
- Fleming C. C., Rao, J.; Moreland, B.; Craig, D. & Turner, S. J. (2000). Diagnostics of cyst nematodes and tephritid fruit flies using mitochondrial and ribosomal DNA. *EPPO Bulletin*, 30, 585–590.
- Flier, W. G.; van de Bosch, G. B. M. & Turkensteen, L. J. (2003). Epidemiological importance of *Solanum sisymbriifolium*, *S. nigrum* and *S. dulcamara* as alternative hosts for *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 52, 595-603.
- Foot, M. A. (1977). Laboratory rearing of potato cyst nematode; a method suitable for pathotyping and biological studies. *New Zealand Journal of Zoology*, 4, 183-186.
- Fullaondo A.; Barrena, E. M.; Viribay, I.; Barrena, A. S. & Ritter, E. (1999). Identification of potato cyst nematode species *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* by PCR using specific primer combinations. *Nematology*, 1, 157-163.
- Global Invasive Species Database (2005) *Solanum sisymbriifolium*. (GISD), Web site. Acedido em Abril 25, 2015 em <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=1216&fr=1&sts=&lang=EN>.
- Green, J.; Wang, D.; Lilley, C. J.; Urwin, P. E. & Atkinson, H. J. (2012). Transgenic potatoes for potato cyst nematodes control can replace pesticide use without impact on soli quality. *PlosOne*, 7, 1-9.
- Hahn-Deinstrop, E. (2007). *Applied thin-layer chromatography*. (Second Edition). Weinhein, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley VCH.
- Hawkes, J. G. (1978). History of the potato. In: Harris, P.M. (ed.), *The Potato Crop*. Chapman and Hall, London, 730 pp.
- Holgado, R. & Magnusson, C. (2010). Management of PCN (*Globodera* spp.) populations under Norwegian conditions. *Aspects of Applied Biology*, 103 In, 3rd *Symposium on Potato Cyst Nematodes*.
- Hunter, I. R.; Walden, M. K.; Wagner, J. R. & Heftmann, E. (1976). High-pressure liquid chromatography of steroidal alkaloids. *Journal of Chromatography*, 119, 223-226.

- Ibarrola, D. A.; Helli6n-Ibarrola, M. C.; Montalbetti, Y.; Heoinichen, O.; Alvarenga, N.; Figueredo, A. & Ferro, E. A. (2000). Isolation of hipotensive compounds from *Solanum sisymbriifolium* Lam.. *Journal of Ethnopharmacology*, 70, 301-307.
- Instituto Nacional de Investiga76o Agr6ria e Veterin6ria (2012). Nem6todes-de-quisto da batateira – *Globodera rostochienesis* e *G. pallida* (INIAV), Web site. Acedido em Mar7o 22, 2015 em http://www.iniaav.pt/fotos/editor2/globodera_rostochiensis_e_g_pallida__nematodos_de_quisto_da_batateira.pdf.
- Kaplan, D. T. & Keen, N. T. (1980). Mechanisms conferring plant incompatibility to nematodes. *Revue de N6matologie*, 3, 123-134.
- Karaer, F. & Kutbay, H. G. (2007). *Solanum sisymbriifolium* Lam. (Solanaceae): A New Record for Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 31, 481- 483.
- La Fundaci6n para el Conocimiento madrid (2002). *Globodera* ciclo de vida (Madrid) Web site. Acedido em Abril 3, 2015 em http://www.madrimasd.org/blogs/universo/wp-content/blogs.dir/42/files/163/o_Globodera%20Ciclo%20de%20Vida.jpg.
- Lambert, K. & Bekal, S. (2002). Introduction to plant-parasitic nematodes. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-1218-01.
- Lord, J. S.; Lazzeri, L.; Atkinson, H. J. & Urwin, P E. (2011). Biofumigation for control of pale potato cyst nematodes: activity of Brassica leaf extracts and green manures on *Globodera pallida* in vitro and in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7882–7890.
- Madani, I. M.; Ward L. J. & De Boer, S. H. (2008). Multiplex real-time polymerase chain reaction for identifying potato cyst nematodes, *Globodera pallida* and *Globodera rostochiensis*, and the tobacco cyst nematode, *Globodera tabacum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 30, 554-564.
- Mai, W. F. (1976). Worldwide distribution of potato-cyst nematodes and their importance in crop production. *Journal of Nematology*, 9, 30-34.
- Marks, R. J. & Brodie, B. B. (1998). *Potato cyst nematode: Biology, distribution and control*. Wallingford: CAB International.
- Mcknzie, M. M. & Turner, S. J. (1987). Assessing reproduction of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* and *G. pallida*) on potato cultivars for National Listing. *EPPO Bulletin*, 17, 7-25.

- Minnis, S. T.; Haydock, P. P. J.; Ibrahim, S. K.; Grove, I. G.; Evans, K. & Russell, M. D. (2002). Potato cyst nematodes in England and Wales – occurrence and distribution. *Annals of Applied Biology*, 140, 187–195.
- Mulholland, V.; Carde, L.; O'Donnell, K. J.; Fleming, C. C. & Powers, T. O. (1996). Use of the polymerase chain reaction to discriminate potato cyst nematode at the species level. In G. Marshall (ed.), *Diagnostics in Crop Protection* (247–252). British Crop Protection Council, Farnham, UK.
- Mulvey, R. H. & Stone, A. R. (1976). Description of *Punctodera matodorensis* n. gen., n. sp. (nematoda: *Heteroderidae*) from Saskatchewan with list of species and generic diagnosis of *Globodera*, *Heterodera*, and *Sarisodera*. *Canadian Journal of Zoology*, 54, 772-785.
- Pestana, M.; Gouveia, M. & Abrantes, I. M. de O. (2008). Efeitos de *Solanum sisymbriifolium* e *S. nigrum* sobre o nemátode-das-lesões-radicales *Pratylenchus goodeyi*, parasita da bananeira. In 5º Congresso da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia.
- Renčo, M.; Sasanelli, N. & Maistrello, L. (2014). Plants as natural sources of nematocides. In Davis, L.M., (ed.), *Nematodes* (115-141) Nova Science Publishers, Inc.
- Roberts, P. A. (1992). Current status of the availability, development, and use of host plant resistance to nematodes. *Journal of Nematology*, 24, 213-227.
- Santos, M. S. N. de A. & Fernandes, M. F. N. (1988). The occurrence of *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* in Portugal. *Nematologia Mediterranea*, 16,145.
- Santos, M. S. N. de A.; Evans, K.; Abreu, C. A.; Martins, F. F. & Abrantes, I. M. de O. (1995). A review of potato cyst nematodes in Portugal. *Nematologia Mediterranea*, 23, 35-42.
- Sarker, S. D.; Latif, Z. & Gray, A. I. (2005). *Natural product isolation*. (Second Edition). New Jersey: Press, Totowa.
- Sasaki-Crawley, A.; Curtis, R.; Birkett, M.; Powers, S.; Papadopoulos, A.; Pickett, J.; Blackshaw, R. & Kerry, B. (2010). Signaling and behavior of potato cyst nematode in the rhizosphere of the trap crop, *Solanum sisymbriifolium*. *Aspects of Applied Biology*, 103, In 3rd Symposium on Potato Cyst Nematode.
- Scholte, K. (2000a). Effect of potato used as a trap crop on potato cyst nematodes and other soil pathogens and on the growth of a subsequent main potato crop. *Annals of Applied Biology*, 136, 229–238.

- Scholte, K. (2000b). Screening of non-tuber bearing Solanaceae for resistance to and induction of juvenile hatch of potato cyst nematodes and their potential for trap cropping. *Annals of Applied Biology*, 136, 239–246.
- Scholte K. (2000c). Growth and development of plants with a potential for use as trap crop for potato cyst nematode and their effects on the numbers of juveniles in cysts. *Annals of Applied Biology*, 137, 031-042.
- Scholte, K. & Vos, J. (2000). Effects of potential trap crops and planting date on soil infestation with potato cyst nematodes and root-knot nematodes. *Annals of Applied Biology*, 137, 153–164.
- Schomaker, C. H. & Been, T. H. (1999). A model for infestation foci of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Phytopathology*, 89, 583-590.
- Shepherd, A. M. (1986). Extration and estimation of cyst nematodes. In Southey, J. F. (ed), *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes* (31-49). Technical Bulletin N° 2, 6th Edition, Ministry of Agriculture Fisheries and Food, London, H. M. S. O.
- Shields, R.; Fleming, C. C. & Stratford, R. (1996). Identification of potato cyst nematodes using the polymerase chain reaction. *Fundamentals of Applied Nematology*, 19, 167-173.
- Siddiqui, Z. A. & Mahmood, I. (1996). Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review. *Bioresource Technology*, 58, 229-239.
- Siddiqui, Z. A. & Mahmood, I. (1999). Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: A review. *Bioresource Technology*, 69, 167-179.
- Silva, T. M. S; Batista, M. M.; Camara, C. A. & Agra, M. F. (2005). Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum* spp. (Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 99, 419–425.
- Sirca, S. & Urek, G. (2004). Morphometrical and ribosomal DNA sequence analysis of *Globodera achilleae* from Slovenia. *Russian Journal of Nematology*, 2, 161-168.
- Sirca, S.; Geric Stare, B.; Strajnar, P. & Urek, G. (2010). PCR-RFLP diagnostic method for identifying *Globodera* species in Slovenia. *Phytopathology Mediterranean Journal*, 361-369.
- Skantar, A. M.; Handoo, Z. A.; Carta, L. K. & Chitwood, D. J. (2007). Morphological and molecular identification of *Globodera pallida* associated with potato in Idaho. *Journal of Nematology*, 39, 113–144.

- Stone, A. R. (1973). *Heterodera pallida* n.sp. (Nematoda: *Heteroderidae*), a second species of potato cyst nematodes. *Nematologica*, 18, 591-606.
- Stone, A. R. (1985). Co-evolution of potato cyst nematodes and their hosts: implications for pathotypes and resistance. *EPPO Bulletin*, 15, 131-137.
- Subbotin, S.; Halford, P.; Warry, A. & Perry, R. (2000). Variations in ribosomal DNA sequences and phylogeny of *Globodera* parasitizing solanaceous plants. *Nematology*, 2, 591-604.
- Thiery, M. & Mugniery, D. (1996). Interspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in *Globodera* species, parasites of solanaceous plants. *Fundamental and Applied Nematology*, 19, 471-479.
- Timmermans, B. G. H. (2005). *Solanum sisymbriifolium* (Lam.): a trap crop for potato cyst nematodes. PhD Thesis. University of Wageningen, Wageningen, The Netherlands.
- Tobin, J. D.; Haydock, P. P. J.; Hare, M. C.; Woods, S. R. & Crump, D. H. (2008). Effect of the fungus *Pochonia chlamydospora* and fosthiazare on the multiplication rate of potato cyst nematodes (*Globodera pallida* and *G. rostochiensis*) in potato crops grow under UK field conditions. *Biological Control*, 46, 194-201.
- Turner, S. J. & Subbotin, S. A. (2013). Plant Nematology (2nd edition) In Perry, R. & Moens, M. (Eds) *Cyst nematodes: life-cycle and behavior* (111-116). Oxford, UK: CABI Publishing.
- Vermerris, W. & Nicholson, R. (2006). *Phenolic compound biochemistry*. USA: Springer.
- Wagner, H. & Blatt, S. (1996). *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas*. (Second Edition). Verlag Berlin Heidelberg New York: Springer.
- Watts, W. D. J.; Grove, I. G.; Tomalin, G. R. & Back, M. A. (2014). Field screening of biofumigant species for the reduction of potato cyst nematodes (*Globodera* sp.). *Aspects of Applied Biology*, 126, In 5th *International Symposium of Biofumigation*.
- Widdowson, E. (1958a). Potato root diffusate production. *Nematologica*, 3, 6-14.
- Widdowson, E. (1958b). Observations on the collection and storage of potato root diffusate. *Nematologica*, 3, 173-178.

Williamson, V. M. & Gleason, C. A. (2003). Plant-nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 327-333.

Williamson, V. M. & Hussey, R. S. (1996). Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell*, 1735-1745.

Wood, C.; Kenyon, D. & Cooper, J. (2014). *In vitro* hatching of *Globodera pallida* by isothiocyanates. *Aspects of Applied Biology*, 126, In 5th International Symposium of Biofumigation.