

Universidade do Minho
Escola de Ciências

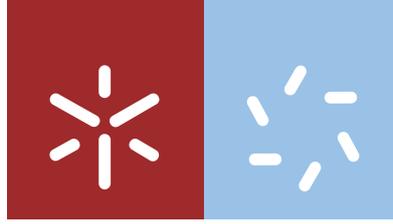
David Vila Pires

Avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus* spp.) a *Meloidogyne javanica*

David Vila Pires. Avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus* spp.) a *Meloidogyne javanica*

UMinho | 2016

janeiro de 2016



Universidade do Minho
Escola de Ciências

David Vila Pires

Avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus* spp.) a *Meloidogyne javanica*

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Ecologia

Trabalho realizado sob orientação da
**Professora Doutora Maria Teresa da Silva Craveiro
Martins de Almeida**
e da
**Professora Doutora Isabel de Maria Cardoso
Gonsalves Mourão**

janeiro de 2016

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Teresa Martins de Almeida, à Professora Doutora Isabel Mourão e à Doutora Sofia Costa, serei sempre grato pela tão douta orientação e supervisão, por contribuírem para a minha formação como investigador, pelos conhecimentos que me transmitiram e pelos conselhos que me deram ao longo destes meses. Os seus ensinamentos constantes, metódicos e rigorosos acompanharam sempre este trabalho, sem esquecer a análise crítica e detalhada desta dissertação, que muito contribuíram para a melhoria da sua apresentação final.

Aos meus pais, por apostarem na minha educação e formação, por todos os sacrifícios que fizeram por mim, por motivarem-me a não desistir, até mesmo quando a motivação me faltou, e aos meus irmãos, pelo apoio incondicional e por ouvirem os meus desabaços, por estarem sempre presentes e por nunca desistirem de mim.

À Andreia Teixeira e aos meus restantes amigos, agradeço a ajuda, conselhos e paciência, por estarem sempre ao meu lado ao longo dos anos.

Ao Senhor Jorge Manuel Dias, da empresa de sementes Alípio Dias & Irmão Lda., à empresa Tozer Iberica SL e à Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, pela amabilidade em cederem as sementes necessárias à realização deste trabalho e à Professora Doutora Isabel Abrantes, do Laboratório de Nematologia da Universidade de Coimbra, pela facilidade na disponibilização do isolado da espécie *Meloidogyne javanica*.

Aos meus colegas do Laboratório de Biodiversidade, por proporcionarem um bom ambiente e à Joana Faria, sobretudo, pela ajuda e boa disposição, que foram sempre tão agradáveis.

Ao Doutor Luís Correia, por toda a ajuda incansável na esterilização do material e por ser uma pessoa fenomenal, e a todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, à realização deste trabalho.

O meu muito obrigado a todos.

Resumo

A cultura de feijoeiro (*Phaseolus* spp.) é das mais antigas do mundo e, sem dúvida, das mais relevantes a nível nutricional, repercutindo-se na sua relevância económica e social. Entre as diversas pragas e doenças que afetam o feijoeiro, estão reportados os nemátodes fitoparasitas, sendo os nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR), *Meloidogyne* spp., os que mais se destacam pelas perdas económicas que causam. É amplamente conhecido o seu efeito devastador em culturas hortícolas, limitando o crescimento das plantas e reduzindo a produção comercializável. A principal estratégia de controlo de NGR assenta na aplicação de nematodocidas, os quais têm vindo a ser progressivamente restringidos. Nesta sequência, têm sido consideradas técnicas de controlo alternativas, sendo a enxertia de hortícolas com cultivares resistentes a estes nemátodes, uma estratégia promissora. A enxertia de feijoeiro é uma técnica emergente em Portugal, país pioneiro na enxertia destas plantas, na Europa.

Integrando-se este trabalho na investigação sobre potenciais porta-enxertos resistentes a NGR, foi testada a resistência/suscetibilidade de nove cultivares de feijoeiro (*P. vulgaris* e *P. coccineus*) a *M. javanica*. O estudo incluiu cultivares nacionais regionais e melhoradas e ainda cultivares comerciais. Nenhuma das nove cultivares testadas foi completamente resistente ao nemátode, permitindo a sua reprodução e sofrendo danos significativos nas raízes. No entanto, através de uma análise comparativa da reação das várias cultivares, foi possível detetar um potencial de resistência nas cultivares Bencanta e Oriente, em que foram registados níveis do número de galhas, de massas de ovos e de reprodução dos nemátodes comparáveis aos de cultivares classificadas como resistentes.

As cultivares Bencanta e Oriente revelaram resultados promissores para a sua utilização como porta-enxertos de feijoeiro, com alguma resistência a *M. javanica*, justificando-se uma investigação mais aprofundada para testar e avaliar a viabilidade da utilização destas duas cultivares na enxertia de feijoeiro, em condições controladas e no campo.

Palavras-chave: agricultura, cultivares resistentes, enxertia de hortícolas, fitopatologia, nemátode-das-galhas-radiculares.

Abstract

The common bean (*Phaseolus* spp.) is one of the oldest crops in the world and undoubtedly one of the most economically, socially and nutritionally relevant. Among the numerous pests and diseases that affect common bean, root-knot nematodes (RKN), *Meloidogyne* spp., are the ones that stand out for the economic losses they cause. Their devastating effect on horticultural crops is widely known, limiting plant growth and reducing marketable production. The main RKN control strategy is based on the application of nematicides, which have been progressively restricted. As such, alternative nematode management methods have been considered, such as vegetable grafting using resistant cultivars. Bean grafting is an emerging technique in Portugal, pioneer in the grafting of these plants in Europe.

This work aimed at finding potential rootstocks resistant to RKN, by testing the resistance/susceptibility of nine cultivars of common bean (*P. vulgaris* and *P. coccineus*) to *M. javanica*. The present study included landrace, national and commercial cultivars. None of the nine cultivars tested was completely resistant to the nematode, allowing its reproduction and sustaining significant damage to the roots. However, through a comparative analysis of the reaction of the various cultivars, it was possible to detect a potential of resistance in Bencanta and Oriente cultivars that is comparable to that of cultivars classified as resistant.

The Bencanta and Oriente cultivars revealed promising results for use as bean rootstocks resistant to *M. javanica*, justifying further research to test and assess the feasibility of their use in bean grafting under controlled conditions and in the field.

Keywords: agriculture, phytopathology, resistant cultivars, root-knot nematode, vegetable grafting.

Índice

Resumo	iv
Abstract.....	v
I. Introdução	2
1. A cultura do feijoeiro	2
2. Nemátodes-das-galhas-radiculares	4
3. Estratégias de controlo de nemátodes-das-galhas-radiculares	10
4. Enxertia de hortícolas	12
II. Material e Métodos.....	18
1. Obtenção do inóculo de <i>M. javanica</i>	18
2. Obtenção das plantas de tomateiro	20
3. Obtenção das plantas de feijoeiro	20
4. Desenho experimental.....	21
5. Avaliação da reação das cultivares de feijoeiro a <i>M. javanica</i>	22
6. Tratamento estatístico	25
III. Resultados.....	27
1. Reação das cultivares de feijoeiro a <i>M. javanica</i>	27
2. Avaliação da resistência das cultivares de feijoeiro a <i>M. javanica</i>	32
IV. Discussão.....	36
V. Considerações Finais	42
VI. Referências Bibliográficas	44

Introdução

I. Introdução

Com a explosão demográfica global e conseqüente elevada procura de alimento para sustentar as populações humanas, em ecossistemas progressivamente mais degradados, torna-se imprescindível produzir em grandes quantidades mas mantendo a sustentabilidade da produção. A ação de parasitas e outros organismos patogénicos constitui uma ameaça permanente às culturas, reduzindo a produção em relação ao seu potencial e traduzindo-se, muitas vezes, em perdas económicas importantes para os produtores (Wesemael & Moens, 2012).

1. A cultura do feijoeiro

A cultura de feijoeiro (*Phaseolus* spp.), originária da América Central e da América do Sul, é das mais antigas do mundo e, sem dúvida, das mais relevantes a nível económico, social e nutricional. A sua importância económica advém de o feijão ser fácil de produzir em grandes quantidades e em climas variados. O facto de ser principalmente consumido por classes económicas mais baixas, torna o feijão um alimento socialmente relevante. As suas qualidades nutricionais também não podem ser desprezadas, já que constitui uma importante fonte de proteína, especialmente onde o consumo de proteína animal é relativamente escasso (Beninger & Hosfield, 2003; Broughton *et al.*, 2003; Pires *et al.*, 2005; Dinelli *et al.*, 2006; Baida *et al.*, 2011; Romero-Arenas *et al.*, 2013).

O género *Phaseolus* inclui atualmente cerca de 56 espécies. O feijão-comum (*P. vulgaris*) é uma das quatro espécies do género que é cultivada. As outras são *P. acutifolius* (feijão tepari), *P. coccineus* (feijoca) e *P. lunatus* (feijão-de-limão). Acredita-se que a especiação de *P. vulgaris* tenha ocorrido no centro meso-americano (México e América Central), uma vez que esta região contém as 56 espécies de *Phaseolus* conhecidas, incluindo as quatro espécies cultivadas (Almeida, 2006).

O feijoeiro, tal como é cultivado nos climas temperados, é uma planta herbácea, anual, com uma morfologia variável consoante os grupos de cultivares. O sistema radicular é aprumado, superficial e pouco extenso. A simbiose com rizóbios, visível pela formação de nódulos nas raízes, poderá favorecer esta planta leguminosa, constituindo uma importante fonte de azoto, fixado da atmosfera pelas bactérias (Almeida, 2006).

Em Portugal, as primeiras culturas de feijoeiro foram introduzidas por volta de 1500, tendo o nosso país sido provavelmente um dos primeiros países europeus a iniciar a cultura destas leguminosas. A espécie que melhor se adaptou a estas condições ambientais foi *P. vulgaris*. Após a sua introdução, os agricultores selecionaram e mantiveram uma grande diversidade de variedades tradicionais, daí que exista atualmente um elevado número em cultivo, bem adaptadas aos mais diversos tipos edafoclimáticos (Ricardo & Baeta, 1982).

Embora sejam termos relacionados, existe alguma confusão na linguagem comum entre os conceitos de cultivar e variedade e, por isso, convém distingui-los. De acordo com a definição da convenção da União Internacional para a Proteção de Novas Variedades de Plantas (UPOV), uma variedade vegetal é “um conjunto vegetal, pertencente a um mesmo taxon botânico, da ordem mais baixa conhecida”. Esta definição esclarece que uma variedade deve: 1) ter características morfológicas reconhecíveis; 2) ser diferente de qualquer outra variedade; e 3) permanecer inalterada ao longo do processo de propagação. Por outro lado, o Código Internacional de Nomenclatura das Plantas Cultivadas (ICNCP) define uma cultivar como “um grupo de plantas que foram selecionadas por uma característica particular ou combinação de características”. Na verdade, cultivar significa “variedade cultivada.” Assim, uma cultivar resulta de um processo de seleção pelo Homem, enquanto a variedade ocorre naturalmente (Haynes, 2008; Brickell *et al.*, 2009). Diferentes cultivares podem pertencer a uma mesma variedade.

A produção mundial de feijão aumentou 59,1% entre 1961 e 2005 (Wander *et al.*, 2007). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), os cinco países com maior produção de feijão seco, entre 1990 e 2013, são, por ordem decrescente: a Índia, o Brasil, a Birmânia, a China e os Estados Unidos da América. Ainda de acordo com dados da FAO, a produção de feijão seco em

Portugal passou de 31 007 toneladas em 1990, para apenas 2 372 toneladas no ano de 2013. Os principais exportadores de feijão a nível europeu, em 2013, foram a Espanha, a França e o Reino Unido (Anuário Agrícola, 2014).

São muitas as pragas e doenças que afetam a cultura do feijoeiro. Estão descritas cerca de 60 doenças parasitárias, das quais cerca de 30 são provocadas por fungos, 18 por vírus, 5 por bactérias, 5 por nemátodes e duas causadas por fitoplasmas (Hagedorn & Inglis, 1986; Almeida, 2006).

Entre os fitoparasitas que mais se destacam pelas perdas económicas que causam em culturas hortícolas, encontram-se os nemátodes, os quais podem reduzir a produtividade de *P. vulgaris* entre 50% a 90% (Ngundo & Taylor, 1974; Abawi & Varon De Agudelo, 1989; Mullin *et al.*, 1991b).

2. Nemátodes-das-galhas-radiculares

Dos organismos pertencentes ao Filo Nematoda conhecem-se mais de 26 000 espécies (Hugot *et al.*, 2001), de uma estimativa global de mais de 1 milhão de espécies (Scheffers *et al.*, 2012). Estes animais são abundantes e amplamente distribuídos em todos os tipos de habitats que contenham a humidade e nutrientes necessários (Yeates, 1979; Boag & Yeates, 1998). Em termos de indivíduos, os nemátodes são os metazoários mais abundantes no solo, com densidades que variam entre $7,6 \times 10^5 \text{ m}^{-2}$, num ambiente desértico, e $2,9 \times 10^7 \text{ m}^{-2}$ numa floresta caducifólia mista (Bernard, 1992). No entanto, por causa das suas reduzidas dimensões, os nemátodes compreendem muitas vezes apenas uma pequena fração da biomassa total de animais do solo, estimados em menos de 10% na maioria dos biomas (Fierer *et al.*, 2009). Em valor absoluto, a biomassa de nemátodes pode representar $6,5 \text{ kg ha}^{-1}$ numa floresta tropical (Hodda *et al.*, 1997) ou 38 kg ha^{-1} em campos de clima temperado (Sohlenius, 1980). Devido às suas características biológicas, estes organismos respondem a mudanças nas condições ambientais. Na verdade, em cadeias tróficas do solo, os nemátodes estão envolvidos na transformação de matéria orgânica em nutrientes minerais e orgânicos, que podem ser absorvidos pelas plantas, podendo potenciar o crescimento da planta e a produtividade das culturas (Ingham *et al.*, 1985; Ferris *et al.*, 1998, 2004). A alimentação dos nemátodes contribui para a estabilidade da cadeia alimentar no solo

(Yeates *et al.*, 2009). Pela sua elevada diversidade funcional e intervenção em processos fundamentais no solo, os nemátodes têm vindo a ser utilizados como indicadores da condição de solo, especialmente em termos de resposta a curto prazo às alterações ambientais (Bongers, 1990; Ettema & Bongers, 1993; Neher & Campbell, 1994).

Os nemátodes podem ser parasitas de animais (vertebrados e invertebrados), parasitas de plantas (ecto e endoparasitas) ou ter vida livre. As espécies de vida livre são encontradas nos poros do solo, que precisa de ser processado para se averiguar a sua presença (Nicol *et al.*, 2011). Os nemátodes de vida livre incluem os grupos tróficos bacterívoros, fungívoros, omnívoros e predadores (Yeates *et al.*, 1993). O nemátode mais estudado é, de longe, o bacterívoro *Caenorhabditis elegans* (Blaxter, 2011), um organismo-modelo da biologia, sendo o primeiro animal a ter o seu genoma completamente sequenciado (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Atualmente estão descritas mais de 4 100 espécies de nemátodes fitoparasitas (Decraemer & Hunt, 2006).

Os nemátodes fitoparasitas são geralmente microscópicos (tendo menos de 1 mm de comprimento) e podem estar associados às raízes ou à parte aérea das plantas, com as quais podem interagir de várias maneiras. Possuem na extremidade anterior um estilete geralmente oco e extensível, funcionando como agulha ou lança bucal, capaz de penetrar a parede celular e permitir a alimentação, ou mesmo a entrada do próprio nemátode na raiz. Todos os nemátodes fitoparasitas são parasitas obrigatórios, não conseguindo completar o seu ciclo de vida sem se alimentarem das plantas.

Os danos causados por nemátodes fitoparasitas foram estimados em muitos milhões de dólares anuais mas é provável que o impacto económico real seja ainda maior, uma vez que os países em vias de desenvolvimento desconhecem, muitas vezes, a presença destes agentes patogénicos no solo (Nicol *et al.*, 2011).

De acordo com a forma e local de alimentação dos nemátodes fitoparasitas, estes podem classificar-se como ectoparasitas ou endoparasitas, e entre estes, sedentários ou migratórios (Jones & Jones, 1964). Os nemátodes ectoparasitas permanecem fora da planta e alimentam-se, normalmente, nos pelos radiculares ou no tecido cortical da superfície externa da planta. Muitas vezes encontram-se em grandes densidades, mas nem sempre causam problemas. No entanto, podem causar sérios estragos se a planta estiver sujeita a outros stresses bióticos ou abióticos (Yeates *et al.*, 1993; Coyne *et al.*,

2007). Os endoparasitas, que podem ser migratórios ou sedentários, passam a maior parte do seu ciclo de vida dentro de bolbos, raízes ou tubérculos e, portanto, são mais facilmente disseminados inadvertidamente pelo Homem (Nicol *et al.*, 2011). Todos os estádios dos nemátodes endoparasitas migratórios são móveis, exceto o ovo. Os nemátodes deslocam-se dentro da raiz, de célula para célula, ou podem deixar o tecido vegetal para procurar novos locais de alimentação (Jones & Jones, 1964).

Os nemátodes endoparasitas migratórios entram no hospedeiro e movimentam-se nos tecidos radiculares, causando lesões radiculares e danos generalizados (Nicol *et al.*, 2011). No entanto, os nemátodes fitoparasitas que causam mais prejuízos económicos são espécies de nemátodes endoparasitas sedentários, que vivem parte do seu ciclo de vida no interior da raiz, mantendo-se fixos a um local, como os nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR) e os nemátodes-de-quisto (Goeldi, 1892; Chitwood & Chitwood, 1937; Chitwood, 1949; Stone, 1973). Nos nemátodes endoparasitas sedentários, são os jovens do segundo estádio (o estádio vermiforme “infetivo”) que invadem os tecidos vegetais (Jones & Jones, 1964).

Os NGR são endoparasitas obrigatórios que têm uma ampla distribuição geográfica, uma vasta gama de hospedeiros e que requerem plantas saudáveis para permitir o seu desenvolvimento e reprodução (Trudgill, 1997; Trudgill *et al.*, 2000; Karssen, 2002).

O género *Meloidogyne* é considerado desde há muito, e ainda hoje, o mais prejudicial pelos nematologistas (Jones *et al.*, 2013) e conhecem-se atualmente 98 espécies, que parasitam mais de 5 500 espécies de plantas, ou seja, a maioria das plantas superiores (Goodey *et al.*, 1965; Castagnone-Sereno & Danchin, 2014). Em geral, populações deste género podem ocorrer numa ampla gama de tipos de solo, mas a sua associação a danos nas culturas é mais evidente em solos arenosos. No entanto, os danos causados por NGR são muitas vezes desprezados por serem reconhecidos tardiamente, uma vez que podem ser atribuídos a outras causas.

A infeção da planta por NGR afeta negativamente a absorção de água e nutrientes pelas raízes e diminui a taxa de fotossíntese nas folhas, que está negativamente correlacionada com os níveis de inóculo de NGR. Os fotossintatos são, além disso, mobilizados dos rebentos para as raízes, mais especificamente para as células gigantes induzidas pelos nemátodes, de maneira a sustentar o desenvolvimento e

reprodução destes nemátodes (Hussey, 1985; Carneiro *et al.*, 1999). Uma infecção por NGR pode, ainda, levar à supressão de produtividade das plantas e os sintomas não-específicos são causados por um metabolismo alterado, envolvendo geralmente debilidade dos sistemas radiculares e deficiências nutricionais nas folhas, provocando clorose com murchidão temporária em períodos de stresse hídrico e temperaturas elevadas. Alguns destes sintomas diferem, no entanto, de acordo com a espécie e cultivar da planta e podem ser confundidos com os danos associados à carência de nutrientes ou lesões causadas por bactérias, fungos ou vírus patogénicos (Hussey, 1985; Whitehead, 1997). Na verdade, os sintomas na parte aérea da planta são normalmente pouco distintos; as galhas radiculares tipicamente induzidas por NGR podem ser muito pequenas, sendo difíceis de visualizar (Wesemael *et al.*, 2011). Ao invadir a raiz, estes nemátodes estabelecem-se num local do cilindro central, injetando secreções em células do parênquima que causam a sua hipertrofia, com multiplicação nuclear e hiperplasia das células, o que induz a formação de células gigantes e, conseqüentemente, das típicas galhas radiculares (Sasser & Carter, 1985). As espécies com mais importância económica, usualmente referidas como as quatro espécies principais (Chitwood, 1949), são as espécies tropicais *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica*, e a espécie de climas temperados *M. hapla* (Jones *et al.*, 2013). O facto destas espécies terem uma vasta gama de hospedeiros e distribuição global contribuíram para a sua reconhecida importância. Por outro lado, percebeu-se que estas quatro espécies compreendiam mais de 99% de todas as espécies identificadas até 1982, o que já sugeria o seu reconhecido estatuto como as principais espécies (Taylor *et al.*, 1982).

Os NGR causam perdas consideráveis em muitas culturas, especialmente em solo arenoso. Cerca de oito espécies de NGR foram encontradas em países da Região VII do International *Meloidogyne* Project (IMP), que se estendia desde o Golfo Pérsico ao Oceano Atlântico, passando pela Península Arábica e norte de África, até ao sul da Europa. Por ordem de ocorrência e importância económica, estas espécies eram *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. naasi*, *M. artiellia*, *M. exigua* e *M. africana*. Geralmente, *M. javanica* e *M. incognita* foram consideradas as espécies mais difundidas, enquanto que *M. arenaria* e *M. hapla* tinham uma ocorrência mais limitada, sendo as restantes espécies mais raras (Sasser & Carter, 1985).

Os NGR podem causar prejuízos avultados em culturas de feijoeiro *P. vulgaris* L., especialmente em regiões com temperaturas elevadas, um fator que aumenta o

stresse e pode afetar negativamente a resistência das plantas ao parasitismo por parte destes organismos, nestas condições (Omweaga & Roberts, 1992; France & Abawi, 1994). As temperaturas elevadas aceleram o ciclo de vida de NGR, uma vez que a taxa de desenvolvimento dos nemátodes está linearmente relacionada com a temperatura: acima de uma temperatura basal, a duração do ciclo de vida é determinada por dias térmicos, que fornecem uma medida fisiológica de tempo, uma vez que se referem a espécies poiquilotérmicas (Tyler, 1933; Trudgill, 1995; Trudgill *et al.*, 2005). Em zonas tropicais e sub-tropicais, as culturas hortícolas são muito valorizadas e cruciais para uma alimentação equilibrada em locais onde poucos alimentos são importados. Nestas zonas com elevada humidade e temperatura, os ciclos de vida dos NGR são mais curtos, sendo criadas condições abióticas para uma intensa multiplicação dos nemátodes. Alguns estudos mostraram que *M. javanica*, em particular, pode reduzir anualmente a produtividade de culturas de cana de açúcar em 25% nestas regiões (Cadet & Spaul, 2003; Berry *et al.*, 2008). Devido aos NGR, é muito difícil e às vezes impossível cultivar em grandes quantidades (Sasser & Carter, 1985). Em países em vias de desenvolvimento, que têm dificuldades em identificar e gerir populações de agentes patogénicos, alguns campos são simplesmente abandonados quando estes nemátodes se encontram em grandes populações (Nicol *et al.*, 2011). No entanto, os NGR não são um problema exclusivo de zonas tropicais e sub-tropicais. Um estudo em modo de produção biológico, na Alemanha, mostrou que *M. chitwoodi*, *M. hapla* e *M. naasi* estavam presentes em 51% das amostras e podiam causar danos graves (Hallman *et al.*, 2007). Os NGR constituem, portanto, uma séria ameaça a sistemas agrícolas em regiões temperadas e tropicais.

De entre as várias espécies conhecidas de NGR, 23 foram detetadas na Europa (Hunt & Handoo, 2009; Wesemael *et al.*, 2011). Em Portugal, várias espécies deste género, nomeadamente *M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. hapla*, *M. hispanica*, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. lusitanica*, foram associadas a danos causados em culturas importantes (Ibrahim, 1985; Abrantes & Santos, 1991; Abrantes *et al.*, 2008; Conceição *et al.*, 2009). Entre as plantas hospedeiras destes nemátodes, destacam-se o feijoeiro, tomateiro, batateira, oliveira, videira, pimentão, tabaco, amendoim, meloeiro, cenoura, morangueiro, figueira, aipo, pessegueiro e berinjela (Sasser & Carter, 1985). Outras espécies, como *M. minor*, uma espécie recentemente descrita (Karssen, 2004), que é geneticamente próxima de *M. chitwoodi* e *M. fallax*, duas espécies consideradas

organismos de quarentena na União Europeia (Wesemael *et al.*, 2011), são principalmente nefastas para culturas de batata.

Durante o ciclo de vida dos NGR (Fig. 1), o primeiro estágio juvenil (J1), formado após a embriogênese, sofre uma muda ainda dentro do ovo e transforma-se num jovem de segundo estágio (J2), bem visível ao microscópio, ainda dentro do ovo. Após a eclosão, o J2 é o estágio infetivo, apresentando mobilidade e resistência a condições adversas e movendo-se no solo até encontrar a raiz de uma planta hospedeira (Bird & Opperman, 1998). Estes jovens encontram a sua fonte de alimento através da detecção de fitoquímicos libertados pelas raízes. A sua atividade no solo depende da humidade; vivem, migram e invadem raízes, tornando-se metabolicamente inativos quando o solo está seco. Depois de invadir a raiz e estabelecer o local de alimentação, o J2 sofre três novas mudas até atingir o estágio adulto. Sendo sexualmente indiferenciados enquanto J2, estes podem entretanto transformar-se num macho ou numa fêmea. Em plantas sob stresse, com elevada temperatura ou quando a disponibilidade de alimento é insuficiente, é frequente os jovens desenvolverem-se em machos (Triantaphyllou & Hirschmann, 1959; Triantaphyllou, 1973; Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Como estes não se alimentam, a pressão exercida sobre a planta é inferior.

Os adultos exibem um dimorfismo sexual evidente. Os machos são vermiformes e possuem mobilidade. Pouco tempo depois da quarta muda, deixam a raiz e movimentam-se livremente no solo. As fêmeas, saciformes e sedentárias, começam a alimentar-se logo depois da quarta muda, e continuam a fazê-lo até completarem o seu ciclo de vida. São esbranquiçadas, brilhantes e globosas. As espécies de *Meloidogyne* reproduzem-se por fecundação cruzada ou por partenogénese obrigatória ou facultativa (Sasser & Carter, 1985; Ferraz *et al.*, 2001; Castagnone-Sereno & Danchin, 2014). Cada fêmea pode depositar até cerca de 500 ovos numa massa gelatinosa, designando-se este conjunto por massa de ovos. As massas de ovos ficam normalmente expostas no exterior da raiz (Fig. 1).

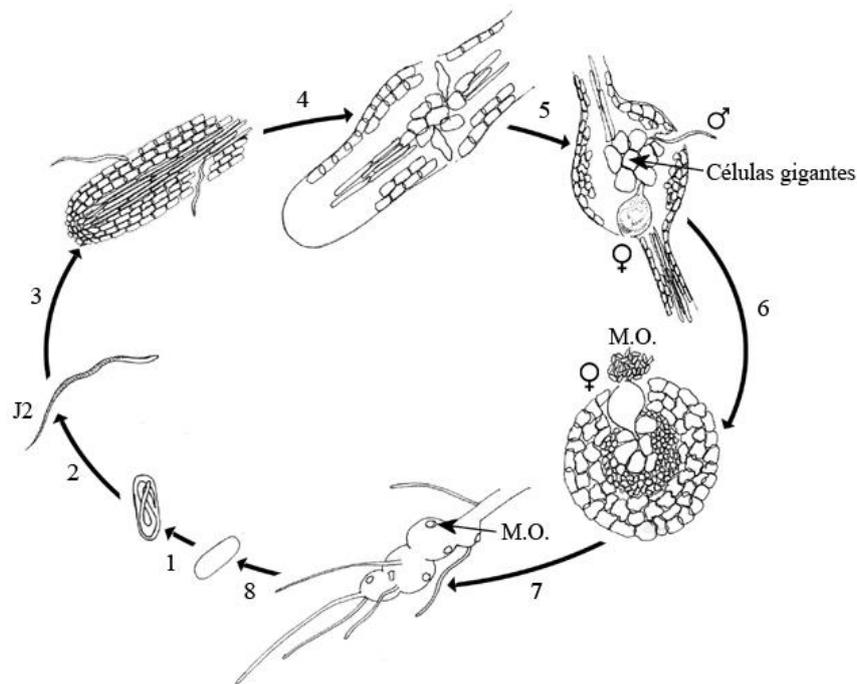


Figura 1. Ciclo de vida do nemátode *Meloidogyne javanica*. (1) o J1 sofre uma muda dentro do ovo e transforma-se em J2; (2) o J2 eclode do ovo; (3) o J2 move-se no solo, localiza e invade uma raiz; (4) estabelecimento do local de alimentação; (5) desenvolvimento em J3 e J4, diferenciação em machos e fêmeas adultos e formação de galhas, em resposta ao parasitismo; (6) a fêmea deposita ovos numa massa gelatinosa; (7) as massas de ovos (M.O.) aparecem visíveis na superfície da raiz; (8) os ovos são libertados no solo, completando o ciclo de vida (Adaptado de Brewster, *American Phytopathological Society*).

3. Estratégias de controlo de nemátodes-das-galhas-radiculares

As formas de controlo de NGR podem ser culturais, biológicas, físicas e químicas. Entre as formas de controlo culturais salienta-se a importância da utilização de cultivares resistentes, nomeadamente na rotação de culturas, em que cultivares resistentes são introduzidas no afolhamento de maneira a reduzir a densidade populacional de nemátodes ao longo do tempo. Apesar de ser uma estratégia de controlo eficaz e sem impactos para o ambiente, esta técnica acarreta alguns problemas: i) a escolha de cultivares resistentes é limitada, uma vez que várias espécies de NGR são polípagas (Castagnone-Sereno & Danchin, 2014) e ii) estas cultivares resistentes, muitas vezes, não têm uma produção desejável. A maneira mais eficaz de contornar estes inconvenientes é a utilização de plantas enxertadas em cultivares resistentes, que aliam

um sistema radicular resistente aos NGR e uma parte aérea com bons parâmetros qualitativos e quantitativos de produção (Mourão & Brito, 2014). Idealmente, o pouso de campos cultivados levaria à morte dos nemátodes fitoparasitas presentes, uma vez que estes não conseguiriam sobreviver sem alimento. No entanto, a polifagia dos NGR permite-lhes manter as suas populações alimentando-se de outras plantas, incluindo plantas espontâneas (Castagnone-Sereno & Danchin, 2014).

O controlo biológico pode incluir a introdução de agentes microbianos, como bactérias e fungos. Contudo, esta estratégia de controlo é extremamente difícil no solo, por se tratar de um ambiente complexo (Krueger & McSorley, 2008) e, se muitas vezes tem sucesso, outras não alcança resultados satisfatórios, sendo difícil avaliar a causa do insucesso (Kerry & Hominick, 2002).

O controlo físico pode ser conseguido usando técnicas como a inundação de campos por períodos extensos ou o recurso à pasteurização, vaporização ou solarização, em que o solo atinge temperaturas letais para os nemátodes. A solarização é a prática mais eficaz e consiste em cobrir o solo com um plástico transparente. A radiação solar incidente no solo é refletida pelo plástico, levando ao aquecimento do solo e criando condições adversas para a maioria dos seres vivos sensíveis à temperatura. No entanto, a presença de nuvens e a chuva limitam a radiação solar e podem diminuir o sucesso da solarização (Katan, 1980; DeVay, 1991). A lavoura é outra técnica usada, que permite misturar o solo, expondo as camadas do solo mais profundo ao sol e tendo como objetivo matar os nemátodes por desidratação, uma vez que estes dependem da humidade para sobreviver. No entanto, esta prática pode matar alguns dos nemátodes que se encontram nas camadas superficiais do solo, mas não é uma solução viável, uma vez que os nemátodes podem migrar para camadas mais profundas do solo para evitar a desidratação e podem tornar-se inativos, o que lhes permite sobreviver nestas condições (Krueger & McSorley, 2008).

A introdução de toxinas sintetizadas por microrganismos ou extratos de plantas e outras substâncias naturais no meio são formas de controlo químico. No entanto, o controlo químico pela aplicação de nematocidas de síntese é o mais eficaz mas é prejudicial para organismos não-alvo e constitui um foco de poluição para o ambiente, pelo que o seu uso está progressivamente a ser restringido (Noling, 1995; Barker & Koenning, 1998; Piskiewicz *et al.*, 2008; Silva, 2012). Na União Europeia, o

Regulamento N.º 2037/2000 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Junho de 2000, relativo às substâncias que empobrecem a camada de ozono, limitou progressivamente a produção, comercialização e aplicação de brometo de metilo, que já foi usado como nematodocida (Zasada *et al.*, 2010) e que se encontra agora banido na Europa. A implementação desta nova legislação tem motivado a procura de meios alternativos de controlo de nemátodes fitoparasitas. Assim, têm sido consideradas alternativas mais seguras para o ambiente e de fácil gestão, nomeadamente a utilização de cultivares resistentes e a enxertia de hortícolas (Amin & Mona, 2014; Mourão & Brito, 2014; Costa, 2015).

4. Enxertia de hortícolas

A incidência de várias doenças inerentes à produção de hortícolas pode ser mitigada pela enxertia de plantas, uma vez que o porta-enxerto pode potenciar a resistência ou tolerância da planta a diversos agentes patogénicos e parasitas do solo, tais como bactérias, fungos e nemátodes (Peil, 2003; Mourão & Brito, 2014). Esta técnica confere, ainda, tolerância a temperaturas adversas e inconstantes, bem como uma maior resistência a outros fatores abióticos do solo, como é o caso da salinidade (Brandão *et al.*, 2003). Por outro lado, a enxertia é bastante favorável ao controlo de doenças em comparação com outras técnicas, como a solarização, o vapor de água e até mesmo a aplicação de pesticidas químicos, já que não exige a mudança drástica no manuseamento da cultura (Brandão *et al.*, 2003).

Numa perspetiva de produção comercial, a técnica de enxertia surgiu no Japão, no início do século passado, com o objetivo de controlar fungos do género *Fusarium* em melancia (Murata & Ohara, 1936). Esta técnica espalhou-se de tal maneira naquele país que, na década de 90, 95%, 60%, 62%, 30% e 10% da área ocupada, respetivamente, com as culturas de melancia, pepino, melão, berinjela e tomateiro era plantada com plantas enxertadas (Shinohara, 1994).

No contexto europeu, o recurso à técnica da enxertia, concretamente em horticultura, teve início na década de 40, sendo os agricultores holandeses os pioneiros desta técnica na cultura do tomate (González, 1999; Peil, 2003).

Em consequência das doenças causadas por agentes patogénicos presentes no solo, em países como Espanha, Holanda e Japão, onde há muito mais tempo se investe na horticultura em ambiente protegido, a enxertia já constitui uma alternativa eficiente de controlo de doenças a curto prazo e, em alguns casos, com custos associados mais baixos em relação a outras formas de controlo (King *et al.*, 2008; Barrett *et al.*, 2012).

Em Portugal, os primeiros ensaios de enxertia de hortícolas foram conduzidos por empresas produtoras de plantas, em 1999, embora a comercialização de produtos resultantes de plantas enxertadas só se tenha iniciado em 2007 (Rodrigues, 2009). Apesar de não reunir consenso em todo o mundo, é provável que o uso desta tecnologia se torne cada vez mais comum, dada a crescente consciencialização dos seus benefícios, junto dos produtores de hortícolas. No entanto, os investigadores devem estar preparados para antecipar e dar resposta aos novos desafios que esta prática acarreta (King *et al.*, 2008; Mourão & Brito, 2014).

A prática da enxertia está associada a aumentos notáveis na produtividade de plantas enxertadas, independentemente da infeção com determinada doença do solo, o que representa um benefício enorme para os produtores (Theodoropoulou *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010; Mourão & Brito, 2014).

A enxertia é uma técnica que consiste na junção de duas partes de tecido vegetal, dando continuidade aos vasos condutores do xilema e do floema, entre as raízes e a parte aérea, permitindo assim o crescimento e desenvolvimento de uma planta única. Esta técnica pressupõe compatibilidade entre duas plantas diferentes e que estas funcionem como uma só depois de enxertadas. O próprio conceito de compatibilidade é definido como a capacidade de duas plantas diferentes, unidas pela enxertia, conviverem satisfatoriamente, como uma única planta (González, 1999). A planta resultante deste processo tem uma parte aérea, constituída pela planta enxerto, e um sistema radicular, sustentado pela planta porta-enxerto (Mourão & Brito, 2014). A compatibilidade é geralmente assegurada quando o enxerto e o porta-enxerto pertencem à mesma espécie ou a espécies botânicas do mesmo género. No entanto, quando a enxertia envolve duas espécies ou géneros diferentes, pode ocorrer incompatibilidade (Hartmann *et al.*, 2002). A incompatibilidade entre o enxerto e o porta-enxerto pode induzir um desenvolvimento anormal do enxerto, levando à diminuição da água disponível e fluxo de nutrientes através dos vasos condutores, na união da parte

enxertada, causando murchidão. Esta incompatibilidade pode dever-se a vários fatores, como diferenças no tecido e estrutura do enxerto e porta-enxerto, características fisiológicas e bioquímicas, diferentes fases ou taxas de crescimento do enxerto e porta-enxerto e condições abióticas (Hassell *et al.*, 2008).

A técnica da enxertia permitiu perceber que pepinos enxertados, cultivados na Grécia, pareciam ser resistentes a NGR (Giannakou & Karpouzas, 2003) e resultados semelhantes foram obtidos em culturas de melancia, em Espanha (Maroto-Borrego & Miguel, 1996). Descobriu-se, ainda, que o controlo destes parasitas em culturas de berinjela e tomate poderia ser obtido utilizando porta-enxertos resistentes (Ioannou, 2001), embora a resistência fosse afetada a temperaturas elevadas (Dropkin, 1969; King *et al.*, 2008). Assim, a utilização de porta-enxertos resistentes a doenças do solo permite reduzir a aplicação de produtos químicos e as vantagens que lhes são normalmente associadas permitem reduzir a densidade de plantação, mantendo ou até elevando a produção (Lee *et al.*, 2010; Mourão & Brito, 2014; Costa, 2015). O aumento da utilização da enxertia em culturas hortícolas é uma tendência relevante, uma vez que esta apresenta resultados promissores no controlo de nemátodes, conferindo, em muitos casos, resistência à proliferação destes fitoparasitas (Braga *et al.*, 2004; Hooks *et al.*, 2010). No entanto, ensaios realizados com tomateiros enxertados mostraram que uma determinada cultivar usada como porta-enxerto pode não apresentar a mesma tolerância às várias espécies de NGR presentes no solo (Verdejo-Lucas *et al.*, 2013). De acordo com este estudo, a utilização de porta-enxertos poderá favorecer a alteração de dominância de espécies de NGR presentes, o que seria previsível pela Hipótese da Rainha de Copas (van Valen, 1976). Segundo esta teoria ecológica, as interações biológicas determinam o sucesso evolutivo de cada população num ecossistema: o declínio de uma espécie de NGR que esteja menos adaptada a um determinado sistema favorecerá a ocupação desse nicho ecológico e, conseqüentemente, o aumento populacional de uma outra espécie. Assim, em vez de eliminar o problema, a utilização de plantas enxertadas poderá levar a que as espécies de NGR mais adaptadas a parasitá-los se estabeleçam, dando origem a um novo desafio (Costa, 2015). Ainda de acordo com a Hipótese da Rainha de Copas, o processo de co-evolução parasita-hospedeiro poderá levar à superação da resistência de uma planta hospedeira por nemátodes fitoparasitas melhor adaptados. De facto, pensa-se que a polifagia de várias espécies de

NGR está relacionada com uma elevada plasticidade fenotípica que depende de uma elevada heterogeneidade genética (Castagnone-Sereno & Danchin, 2014).

Um dos genes mais estudados e que confere resistência a NGR é o gene *Mi*, obtido a partir de um tomateiro selvagem (Williamson, 1998). Este gene já foi introduzido em porta-enxertos de tomateiro, mas ainda não existe um porta-enxerto totalmente resistente a NGR. Além disso, a resistência conferida pelo gene *Mi* é ultrapassada a temperaturas acima dos 28 °C e quebrada por várias populações de NGR (Trudgill & Blok, 2001). Foram já identificados genes responsáveis pela resistência de cultivares de *P. vulgaris* aos NGR (Omweha *et al.*, 1989, 1990a, 1990b, 1992). O primeiro gene dominante identificado em feijoeiro, designado por *Me1*, confere resistência a *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*, mas não a outras espécies de NGR (Omweha *et al.*, 1990a). A resistência conferida por *Me1* é quebrada a 28 °C, uma vez que este gene deixa de ser dominante a esta temperatura (Omweha & Roberts, 1992). Percebeu-se ainda que à temperatura de 28 °C, uma única cópia do gene *Me1* confere resistência parcial, enquanto que duas cópias conferem resistência completa (Omweha & Roberts, 1992).

Objetivos

Uma das estratégias promissoras para a gestão sustentável de agentes patogénicos de origem edáfica, incluindo os NGR, em culturas hortícolas, é a utilização de plantas enxertadas em porta-enxertos resistentes. Atualmente, não há porta-enxertos de feijoeiro disponíveis comercialmente, sendo os viveiristas portugueses pioneiros europeus na busca e seleção de cultivares de feijoeiro com potencial para utilização como porta-enxertos. Considerando a presença de várias espécies de NGR em Portugal, que provocam danos às culturas e a sua capacidade para afetar a cultura do feijoeiro, será necessário avaliar a resistência dos potenciais porta-enxerto a estes nemátodes.

A reação de diferentes variedades e cultivares de uma espécie vegetal aos NGR, como graves limitações do crescimento e formação de galhas é diversa e, por isso, deve ser conhecida. Para tal, contribuem dois processos relevantes: a resistência e a tolerância.

Uma planta que não permita a reprodução dos NGR é considerada resistente. Pelo contrário, se uma planta não apresenta qualquer tipo de defesa ou não inibe a reprodução destes parasitas, é considerada não resistente ou suscetível. Independentemente da reprodução dos nemátodes, uma planta que não exiba danos significativos na raiz quando infetada é considerada tolerante. No caso da planta apresentar danos consideráveis, diz-se que é intolerante (Cook & Evans, 1987). Assim, para avaliar a reação de uma dada cultivar a NGR, será necessário determinar não só a reprodução do nemátode em relação a uma população inicial conhecida (obtendo-se o grau de resistência), como também avaliar os danos causados à planta, através da determinação do número de galhas induzidas nas raízes (obtendo-se a classificação de tolerância).

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a resistência de nove cultivares comerciais, nacionais melhoradas e nacionais regionais de feijoeiro, *Phaseolus* spp., a um dos nemátodes mais prejudiciais e com maior importância económica, *M. javanica*, tendo em vista o seu potencial uso como porta-enxertos de feijoeiro.

Os objetivos mais específicos desta investigação foram:

- 1) conhecer a reação das cultivares de feijoeiro a *M. javanica*, avaliando o seu comportamento como hospedeiras deste nemátode, considerando o seu grau de resistência, através da determinação do fator de reprodução;
- 2) avaliar a severidade dos danos causados no sistema radicular destas cultivares de feijoeiro, com base no número de galhas induzidas na raiz, como indicador do grau de tolerância;
- 3) inferir sobre a potencial utilização das diversas cultivares ou de material vegetal melhorado a partir destas como porta-enxerto comercial de feijoeiro.

Material e Métodos

II. Material e Métodos

A reação de diferentes feijoeiros (*Phaseolus* spp.) a uma população do nemátode-das-galhas-radiculares *Meloidogyne javanica*, que tem sido amplamente usada e cultivada em laboratório há vários anos, foi avaliada em nove cultivares de três categorias diferentes: L1 – comercial; L2 – nacional melhorada; e L3 – nacional regional/*landrace* (Tabela I).

Tabela I. Cultivares das duas espécies do género *Phaseolus*, pertencentes a três categorias (L1, L2 e L3), utilizadas nos ensaios.

Espécie	Cultivar	Categoria
<i>P. vulgaris</i>	Bencanta	Nacional Melhorada (L2)
	Bragançano	Nacional Melhorada (L2)
	Oriente	Comercial (L1)
	Tarrestre	Nacional Regional (L3)
	Vagem Rajada	Nacional Melhorada (L2)
<i>P. coccineus</i>	Aintree	Comercial (L1)
	Feijão de 7 Anos	Nacional Regional (L3)
	Snowstorm	Comercial (L1)
	White Emergo Snowy	Comercial (L1)

Como referência de hospedeiro suscetível a *M. javanica*, foram utilizados tomateiros, *Solanum lycopersicum* cv. Tiny Tim.

1. Obtenção do inóculo de *M. javanica*

O isolado de NGR usado como inóculo nos ensaios foi cedido pela Professora Doutora Isabel Abrantes, do Laboratório de Nematologia da Universidade de Coimbra. É um isolado da população P018 deste laboratório, obtido originalmente a partir de uma

população de batateira (*Solanum tuberosum* L.) infetada, oriunda da Guarda e já caracterizada morfológicamente, com base no padrão perineal, por análise bioquímica segundo o seu fenótipo de esterases e pela caracterização molecular dos genes mtDNA COII e 16S rRNA (Abrantes *et al.*, 2008; Maleita *et al.*, 2012).

O isolado de NGR foi mantido e multiplicado em tomateiro, *Solanum lycopersicum* cv. Tiny Tim.

Os tomateiros previamente infetados foram desenvasados cerca de dois meses depois da inoculação e as raízes lavadas com água da torneira, para libertar partículas de solo aderentes. As raízes foram seguidamente cortadas em segmentos de 2 a 3 cm de comprimento. Este material foi então colocado num frasco schott de 500 ml ao qual se adicionou uma solução de NaOCl a 0,5% (lixívia comercial diluída 10 vezes), agitando-se depois o frasco vigorosamente durante 2 minutos, de maneira a dissolver as massas gelatinosas e libertando os ovos. O conteúdo resultante foi passado por dois crivos metálicos: um de 75 μ m no topo, que recolheu detritos e pedaços de raiz e outro de 20 μ m, na base, o qual reteve a suspensão de ovos. Os ovos foram seguidamente lavados com água corrente para remover os resíduos de NaOCl. Os segmentos de raiz foram passados novamente por água da torneira, para recolher ovos que pudessem ter ficado retidos, e crivados novamente, como descrito anteriormente. A suspensão de ovos retida no crivo de 20 μ m foi recolhida para um copo graduado de 250 ml de capacidade, com a ajuda de um esguicho de água desionizada. O volume da suspensão foi ajustado a um volume conhecido, com água, e a suspensão mantida em agitação, num agitador magnético. Foram recolhidas 3 alíquotas de 1 ml da suspensão obtida e, usando uma placa de contagem, os ovos e jovens do segundo estágio de *M. javanica* presentes em cada amostra foram contados, à lupa; o volume de suspensão a usar como inóculo foi calculado com base na média das 3 alíquotas recolhidas anteriormente, sendo este valor extrapolado para o volume total da suspensão, de maneira a assegurar que o inóculo total por planta seria de 5000 ovos e jovens (J2).

2. Obtenção das plantas de tomateiro

Os tomateiros utilizados para manutenção do isolado e como testemunhas positivas nos ensaios realizados foram obtidos em laboratório a partir de sementes de tomateiro, *Solanum lycopersicum* L., da cultivar Tiny Tim.

As sementes foram colocadas em caixas de Petri, sobre um papel de filtro humedecido com água desionizada, e incubadas numa estufa, à temperatura de 24 °C, por cerca de 5 a 7 dias, até à germinação. Após germinação, as mesmas foram transferidas individualmente para copos de plástico pequenos, com cerca de 3,5 cm de diâmetro, contendo uma mistura de solo e areia, na proporção de 1:1, esterilizada por autoclavagem a 120 °C, durante duas horas, e posteriormente deixada a arejar durante pelo menos 48 horas, para permitir a libertação de possíveis compostos voláteis fitotóxicos. Estas plântulas nos copos pequenos foram colocados numa sala de culturas em ambiente controlado, com temperatura de 25 °C (média), humidade relativa variando entre 45 e 80% e fotoperíodo de 12 horas, durante duas a três semanas. Após esse período, quando os tomateiros apresentavam dois pares de folhas verdadeiras bem desenvolvidas, foram transferidos para vasos de plástico com cerca de 1 L de capacidade, esterilizados previamente com luz ultravioleta numa câmara de fluxo laminar vertical durante 30 minutos e contendo igualmente a mistura de areia e solo esterilizados. As plantas foram regadas diariamente com água da torneira e adubadas, de 15 em 15 dias, com solução nutriente universal (7% N, 5% P₂O₅ e 6% K₂O).

3. Obtenção das plantas de feijoeiro

As sementes de feijoeiro (*Phaseolus* spp.) das cultivares Bencanta (de trepar) e vagem Rajada (de trepar) foram gentilmente cedidas pela empresa Alípio Dias & Irmão Lda. As sementes da cultivar Bragançano (de trepar) foram amavelmente cedidas pela Doutora Sofia Costa. As sementes das cultivares Oriente, Tarrestre e Feijão de 7 Anos foram fornecidas pela Professora Doutora Isabel Mourão, da Escola Superior Agrária de Ponte de Lima. As cultivares Aintree, Snowstorm e White Emergo Snowy foram cedidas pela empresa Tozer Iberica, Espanha.

As sementes foram colocadas a germinar à temperatura ambiente em rolos de papel absorvente previamente humedecidos e, após emergência da radícula, foram transferidos para vasos de plástico com cerca de 8 cm de diâmetro. De seguida, estes foram colocados numa sala de culturas com condições ambientais controladas, anteriormente descritas. Quando as plântulas apresentaram dois pares de folhas verdadeiras, após aproximadamente 15 dias, estavam prontas para integrar os ensaios de reação a *M. javanica*.

4. Desenho experimental

Foram realizados ensaios sucessivamente, com as várias cultivares das três categorias referidas anteriormente que, por questões de logística, não foram todos conduzidos paralelamente. Os ensaios decorreram na sala de culturas com as mesmas condições controladas já descritas na secção 2 do Material e Métodos. Todos os vasos de plástico utilizados foram também previamente esterilizados e neles colocada a mistura de solo e areia (1:1), esterilizada, tal como na secção 2 do Material e Métodos.

De cada cultivar testada, 5 plantas foram inoculadas (tratamento) e outras 5, mantidas sem inóculo, serviram de testemunha negativa. Para garantir a viabilidade do inóculo utilizado, foram ainda usados 5 tomateiros suscetíveis cv. Tiny Tim, como testemunha positiva.

No dia anterior à inoculação, as plantas não foram regadas de maneira a permitir que o solo não estivesse muito húmido.

Para a inoculação, foi obtida uma suspensão de ovos e jovens com um número de nemátodes por volume conhecido, de tomateiros infetados, como descrito anteriormente. A suspensão foi mantida em agitação, sendo pipetado o volume de suspensão necessário para conter 5000 ovos e J2, que foi distribuído uniformemente por três furos feitos no solo, em torno do caule de cada planta a inocular. O inóculo de 5000 ovos e J2 constituiu, portanto, a população inicial nos ensaios (Hussey & Barker, 1973; Barker *et al.*, 1985).

Cada ensaio decorreu durante 60 dias, de maneira a permitir que os nemátodes completassem o seu ciclo de vida. As plantas foram regadas diariamente, sendo fertilizadas com solução nutriente (7% N, 5% P₂O₅ e 6% K₂O), de 3 em 3 semanas.

5. Avaliação da reação das cultivares de feijoeiro a *M. javanica*

Sessenta dias após a inoculação procedeu-se à observação das raízes para determinação do número de galhas e de massas de ovos. Para isso, as plantas foram desvasadas e as raízes devidamente lavadas com água da torneira. Seguidamente foi retirado o excesso de água às raízes com a ajuda de papel absorvente, sendo depois determinado o seu peso fresco.

De modo a facilitar a observação e contagem de massas de ovos ao microscópio estereoscópico, preparou-se uma solução de floxina B (75 mg de floxina B dissolvidos em 500 mL de água destilada), na qual as raízes foram imersas por cerca de 20 minutos. As raízes foram posteriormente retiradas da solução corante e lavadas abundantemente com água, para retirar o excesso de corante (Hartman, 1983).

As massas de ovos, que apareciam avermelhadas na superfície da raiz, foram quantificadas ao microscópio estereoscópico. De cada sistema radicular foram retiradas, quando possível, 10 massas de ovos e os ovos extraídos, seguindo a metodologia de Hussey & Barker (1973), de modo a permitir fazer uma estimativa do número total de ovos por planta (população final).

O número de galhas foi contado e registado, por observação direta das raízes ao microscópio estereoscópico (Sasser *et al.*, 1984).

Com base no número de galhas e massas de ovos observadas, foi atribuído o índice de galhas (GI) e de massas de ovos (EI), respetivamente, de acordo com a Tabela II (Taylor & Sasser, 1978).

Tabela II. Escala* de correspondência entre o número galhas e de massas de ovos de NGR e os respectivos índices.

Nº de galhas ou massas de ovos	Índice de galhas (GI) ou massas de ovos (EI)
0	0
1-2	1
3-10	2
11-30	3
31-100	4
>100	5

*Segundo Taylor & Sasser (1978)

A eficiência de cada cultivar como hospedeira foi avaliada com base em diversos índices: fator de reprodução (Rf) (Sasser *et al.*, 1984), índice de reprodução relativa (RI) (Taylor & Sasser, 1978) e índice de massas de ovos (EI) (Hadisoeganda & Sasser, 1982), conforme as Tabelas III, IV e V.

O valor de Rf é calculado através da razão entre a densidade populacional final de nemátodes (Pf), depois da exposição ao inóculo, e a densidade populacional inicial (Pi), antes da inoculação; se esta razão for superior a 1, significará que ocorreu reprodução e a planta é considerada hospedeira; se a razão for inferior a 1, a planta é normalmente considerada não-hospedeira, o que pode denotar reprodução dos nemátodes, mas não da população.

O valor de RI é obtido através da fórmula $RI = (Rf \text{ test}) / (Rf \text{ padrão}) \times 100\%$, em que:

- Rf test – fator de reprodução da cultivar testada (população final/população inicial);
- Rf padrão – fator de reprodução da cultivar suscetível da mesma espécie, de referência (valor comparável ao do tomateiro, que é amplamente reconhecido como suscetível).

O valor de EI é determinado pelo número de massas de ovos observadas em cada planta, o qual corresponde a um valor tabelado proposto por Taylor & Sasser (1978); se não forem observadas massas de ovos, atribui-se o valor 0; se forem

observadas 1 a 2 massas de ovos, é atribuído o valor 1; entre 3 a 10 massas de ovos observadas, o valor atribuído é 2; para um número de massas de ovos observadas variando entre 11 e 30, atribui-se o valor 3; entre 31 a 100 massas de ovos observadas, é atribuído o valor 4; caso o número de massas de ovos observadas seja superior a 100, o valor máximo atribuído é 5. De seguida, o valor médio de EI para cada cultivar é comparado à escala de classificação de Hadisoeganda & Sasser (1982) e é atribuído o valor de grau de resistência correspondente (Tabela IV).

Tabela III. Classificação* da resistência do hospedeiro a NGR, com base no índice de reprodução relativa (RI).

RI (%)	Resistência
0	Imune
1 – 10	Muito resistente (VR)
10 – 25	Moderadamente resistente (MR)
25 – 50	Pouco resistente (SR)
>50	Suscetível (S)

*Segundo Taylor & Sasser (1978)

Com base nos índices de massas de ovos médios obtidos, foi determinado o grau de resistência (DR) a *M. javanica*, de acordo com a escala de classificação proposta por Hadisoeganda & Sasser (1982) (Tabela IV).

Tabela IV. Escala de classificação* do grau de resistência (DR) do hospedeiro a NGR, com base no índice de massas de ovos (EI).

Índice de massas de ovos (EI)	Grau de resistência (DR)
0,0 – 1,0	Altamente resistente (HR)
1,1 – 3,0	Muito resistente (VR)
3,1 – 3,5	Moderadamente resistente (MR)
3,6 – 4,0	Pouco resistente (SR)
4,1 – 5,0	Suscetível (S)

*Segundo Hadisoeganda & Sasser (1982)

O DR de cada cultivar foi também determinado através do sistema de classificação de Sasser *et al.* (1984), apresentado na Tabela V, com base no GI médio e Rf médio, usando as designações propostas por Canto-Saenz (1983).

Tabela V. Classificação do grau de resistência (DR)* da planta a NGR, com base no índice de galhas (GI) e no fator de reprodução (Rf), de acordo com as designações propostas por Canto-Saenz (1983).

Índice de galhas (GI)	Fator de reprodução (Rf)	Grau de resistência (DR)
≤2	≤1	Resistente
≤2	>1	Tolerante
>2	≤1	Hipersuscetível
>2	>1	Suscetível

*Segundo Sasser *et al.* (1984)

6. Tratamento estatístico

Os resultados obtidos foram analisados com o programa SPSS Statistics 17.0, para Windows. A homogeneidade de variância foi inicialmente averiguada através do teste de Levene, o que permitiu avaliar se as variâncias da população não eram diferentes. Procedeu-se depois a análises fatoriais para avaliar o efeito do inóculo, comparando as várias cultivares, espécies e designações comerciais entre si, utilizando a transformação logística dos dados e o modelo de regressão de Poisson, através do comando *Generalized Linear Models*, à probabilidade de 5%. As diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos foram, então, comparadas entre si através do teste LSD (*Least Significant Difference*) de Fisher, à probabilidade de 5%. Foram apenas comparadas variáveis contínuas de peso radicular, galhas, massas de ovos, ovos por grama de raiz, fator de reprodução e índice de reprodução relativa, de entre as cultivares inoculadas.

Resultados

III. Resultados

1. Reação das cultivares de feijoeiro a *M. javanica*

A população de *Meloidogyne javanica* desenvolveu-se no sistema radicular de todas as cultivares de feijoeiro inoculadas. Os feijoeiros não inoculados não apresentaram infecção por *M. javanica*, o que testemunhou a esterilidade da mistura de solo e areia utilizada nos ensaios. O mesmo se verificou nos tomateiros utilizados como testemunhas positivas da condição do inóculo, nos quais houve infecção e reprodução dos nemátodes.

A inoculação com *M. javanica* parece ter limitado o desenvolvimento radicular, uma vez que foi verificado um maior peso fresco da parte radicular nas plantas testemunhas, em relação às plantas infetadas, com a exceção da cultivar Aintree, em que o peso das raízes foi ligeiramente superior no caso do tratamento (Fig. 2). As diferenças foram significativas nas cultivares Snowstorm, White Emergo Snowy e Vagem Rajada. É também de salientar o maior peso radicular das plantas da espécie *P. coccineus* (cvs. Aintree, Snowstorm, White Emergo Snowy e Feijão de 7 Anos) em relação às de *P. vulgaris* (as restantes cultivares).

Relativamente ao número de galhas produzidas por sistema radicular (Fig. 3), verificou-se um número de galhas significativamente maior nas cultivares Snowstorm e Aintree ($p < 0,05$); foram produzidas, em média, mais de 100 galhas por sistema radicular. A cultivar Bencanta foi a que apresentou menor número de galhas por sistema radicular ($p < 0,05$), tendo produzido, em média, 25 galhas por planta.

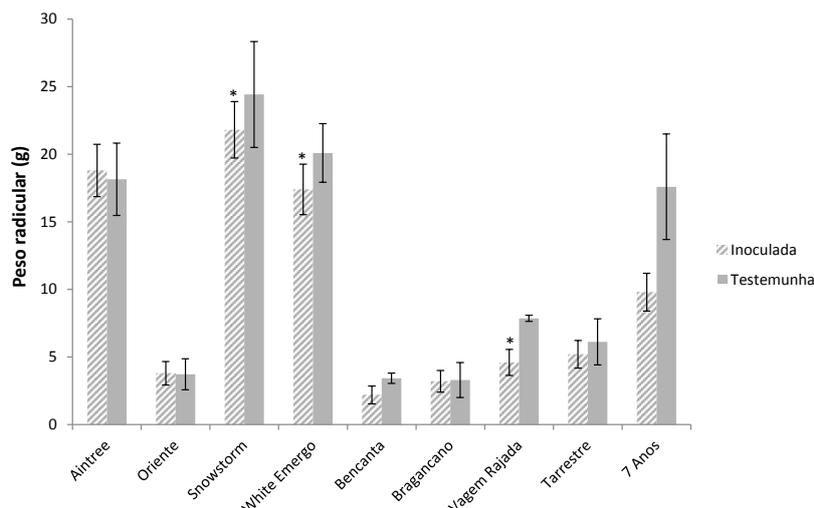


Figura 2. Peso fresco da parte radicular das cultivares testadas, 60 dias após a inoculação com 5000 ovos e J2 de *Meloidogyne javanica*. Os valores apresentados são a média de 5 repetições \pm erro padrão. Os valores assinalados com asterisco indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

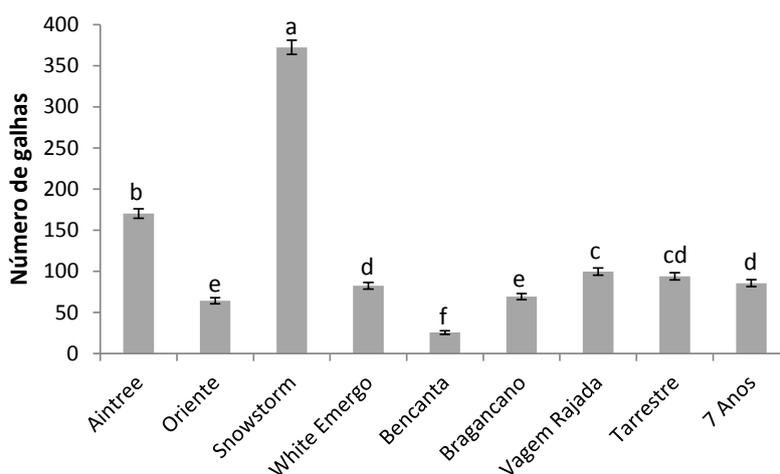


Figura 3. Número de galhas produzidas no sistema radicular das nove cultivares testadas, 60 dias após a inoculação com 5000 ovos e J2 de *Meloidogyne javanica*. Os valores apresentados são a média de 5 repetições \pm erro padrão. Os valores acompanhados da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Foi produzido o maior número de massas de ovos (mais de 64) na cultivar Tarrestre ($p < 0,05$), um número quase 7 vezes superior ao da cultivar White Emergo Snowy, na qual foi produzido o menor número de massas de ovos por sistema radicular ($p < 0,05$), tendo sido observadas pouco mais de 7 massas de ovos, em média (Fig. 4).

Não foram encontradas galhas ou massas de ovos nos feijoeiros utilizados como testemunha negativa. Os tomateiros suscetíveis incluídos como testemunha positiva apresentaram um número médio de 129 galhas e de 60 massas de ovos, por sistema radicular.

As várias cultivares tiveram reações diferentes a *M. javanica*, relativamente ao número de ovos produzidos em cada planta (Fig. 5). As cultivares que permitiram que o nemátode produzisse um maior número de ovos por sistema radicular foram a Tarrestre, Snowstorm e Aintree; foram produzidos nestas cultivares, em média, 81 121, 69 731 e 62 736 ovos, respetivamente ($p < 0,05$). Verificou-se ainda que no sistema radicular da cultivar Bencanta foram apenas produzidos, em média, 2 931 ovos, um número significativamente inferior ao das três cultivares mencionadas anteriormente ($p < 0,05$).

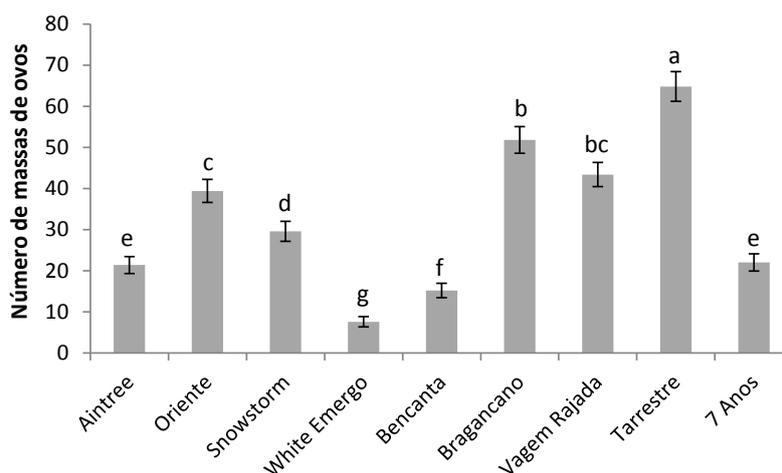


Figura 4. Massas de ovos produzidas no sistema radicular das nove cultivares testadas, 60 dias após a inoculação com 5000 ovos e J2 de *Meloidogyne javanica*. Os valores apresentados são a média de 5 repetições \pm erro padrão. Os valores acompanhados da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O número de ovos produzidos por grama de raiz (Fig. 6) foi mais elevado na cultivar Tarrestre, existindo diferenças significativas em relação às restantes cultivares ($p < 0,05$). O menor número de ovos por grama de raiz, com um valor significativamente inferior, foi registado na cultivar White Emergo Snowy ($p < 0,05$).

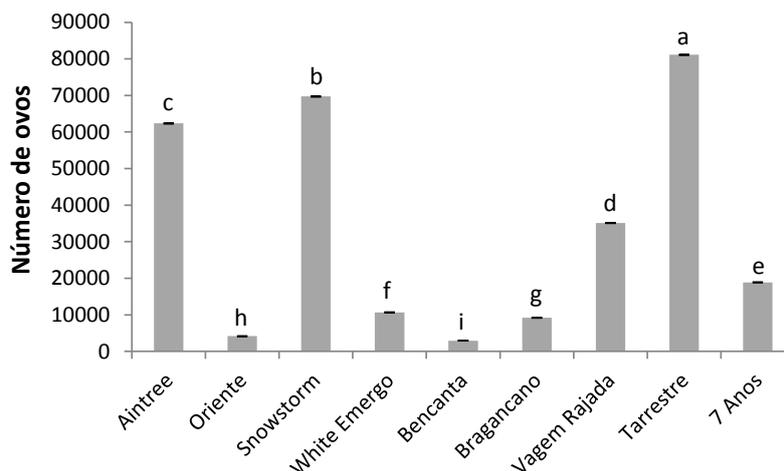


Figura 5. Número de ovos produzidos no sistema radicular das nove cultivares testadas, 60 dias após a inoculação com 5000 ovos e J2 de *Meloidogyne javanica*. Os valores apresentados são a média de 5 repetições \pm erro padrão. Os valores acompanhados da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

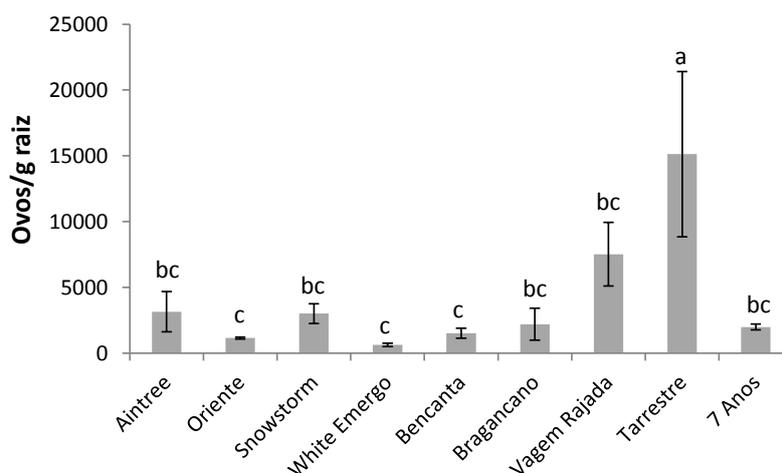


Figura 6. Número de ovos por grama de raiz das nove cultivares testadas, 60 dias após a inoculação com 5000 ovos e J2 de *Meloidogyne javanica*. Os valores apresentados são a média de 5 repetições \pm erro padrão. Os valores acompanhados da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Com base no número de galhas e de massas de ovos produzidas, foram calculados os índices de galhas (GI) e de massas de ovos (EI), e os fatores de

reprodução (Rf). Foi também calculado o RI, tendo sido usadas as cultivares Snowstorm e Tarrestre como padrão para as espécies *P. coccineus* e *P. vulgaris*, respetivamente.

O GI foi mais elevado na cultivar Snowstorm, como mostra a Tabela VI. No entanto, este valor não é estatisticamente diferente do das cultivares Aintree, Vagem Rajada e Tarrestre, que apresentaram um GI de 4,6, segundo a classificação de Hadisoeganda & Sasser (1982). A cultivar que apresentou menos danos foi a Bencanta, com um GI de 3,2. Salienta-se ainda que os valores de GI da cultivar White Emergo Snowy (4,4) são relativamente próximos dos da cultivar Aintree (4,6). Curiosamente, a cultivar Oriente apresentou valores de EI próximos dos da cultivar Snowstorm, embora tenha sido registado o segundo valor mais baixo de RI nesta cultivar.

Tabela VI. Índices de massas de ovos (EI), de galhas (GI) e de reprodução relativa (RI) de *Meloidogyne javanica*, nas cultivares avaliadas.

Cultivar	EI	GI	RI (%)
Aintree	4,8	4,6	89
Bencanta	3,4	3,2	4
Bragançano	4,4	4,0	11
Feijão de 7 Anos	5,0	4,2	27
Oriente	4,8	4,2	5
Snowstorm	5,0	5,0	100
Tarrestre	5,0	4,6	100
Vagem Rajada	4,8	4,6	43
White Emergo Snowy	4,4	4,4	15

O índice de massas de ovos mais elevado foi o das cultivares Snowstorm, Tarrestre e Feijão de 7 Anos, apresentando um EI de 5, o mais elevado da escala. O valor mais baixo de EI foi registado na cultivar Bencanta (3,4).

Relativamente ao índice de reprodução relativa, as cultivares Snowstorm e Tarrestre apresentaram valores muito próximos, com um RI de 100%. Os índices de reprodução mais baixos, respetivamente 4 e 5%, foram obtidos nas cultivares Bencanta e Oriente.

2. Avaliação da resistência das cultivares de feijoeiro a *M. javanica*

Dos vários índices analisados, têm especial relevância o GI e o Rf, utilizados para uma avaliação objetiva da resistência e suscetibilidade das cultivares ao NGR, de acordo com a classificação de Sasser *et al.* (1984).

A razão entre a população final e a população inicial permitiu calcular o fator de reprodução. De acordo com estes valores, o Rf mais elevado foi obtido na cultivar Tarrestre (16,2), não sendo contudo estatisticamente diferente das cultivares Snowstorm e Aintree. O valor mais baixo foi obtido na cultivar Bencanta, com um Rf de 0,6, não sendo estatisticamente diferente do da cultivar Oriente (0,8), que também apresentou um Rf muito baixo, em comparação com as outras cultivares (Tabela VII).

Tabela VII. Grau de resistência das cultivares de feijoeiro testadas a *Meloidogyne javanica*, segundo Sasser *et al.* (1984).

Cultivar	Rf*	GI*	DR
Aintree	12,5 ± 15,2	4,6 ± 0,5	S
Bencanta	0,6 ± 0,2	3,2 ± 0,8	H
Bragançano	1,8 ± 2,7	4,0 ± 0,7	S
Feijão de 7 Anos	3,8 ± 0,9	4,2 ± 0,4	S
Oriente	0,8 ± 0,3	4,2 ± 0,4	H
Snowstorm	14,0 ± 8,6	5,0 ± 0	S
Tarrestre	16,2 ± 14,4	4,6 ± 0,5	S
Vagem Rajada	7,0 ± 6,2	4,6 ± 0,5	S
White Emergo	2,1 ± 0,8	4,4 ± 0,5	S

Rf – fator de reprodução; GI – índice de galhas; DR – grau de resistência; *dados apresentados são a média ± desvio-padrão das repetições analisadas.

As restantes cultivares testadas permitiram o aumento da população de nemátodes em relação ao número inicial, uma vez que o valor de Rf foi superior a 1 em

sete das cultivares avaliadas. Por outro lado, todas as cultivares apresentaram valores de GI superiores a 2.

Deste modo, das nove cultivares de feijoeiro testadas, sete foram consideradas suscetíveis, enquanto duas, Bencanta e Oriente, foram consideradas hipersuscetíveis, de acordo com a classificação de Sasser *et al.* (1984).

Cada cultivar testada foi ainda classificada quanto à sua resistência ou suscetibilidade a *M. javanica*, com base nos valores de RI e EI obtidos, segundo os sistemas de classificação de Taylor & Sasser (1978) e de Hadisoeganda & Sasser (1982) (Tabelas VIII e IX).

Tabela VIII. Grau de resistência das cultivares de feijoeiro testadas a *Meloidogyne javanica*, segundo Taylor & Sasser (1978).

Cultivar	RI (%)	Resistência
Aintree	89	S
Bencanta	4	VR
Bragança	11	MR
Feijão de 7 Anos	27	SR
Oriente	5	VR
Snowstorm	100	S
Tarrestre	100	S
Vagem Rajada	43	SR
White Emergo Snowy	15	MR

RI (%) – índice de reprodução relativa

Com base na classificação do grau de resistência proposta por Taylor & Sasser (1978), constatou-se que as únicas cultivares consideradas muito resistentes foram a Bencanta e a Oriente. As cultivares Bragança e White Emergo Snowy foram consideradas moderadamente resistentes, enquanto as cultivares Feijão de 7 Anos e Vagem Rajada foram pouco resistentes. Das cultivares testadas, três foram suscetíveis a *M. javanica*: Aintree, Snowstorm e Tarrestre.

De acordo com a classificação do grau de resistência proposta por Hadisoeganda & Sasser (1982), verificou-se que todas as cultivares testadas foram suscetíveis ao nemátode, com a exceção da cultivar Bencanta, que foi moderadamente resistente.

Tabela IX. Grau de resistência das cultivares de feijoeiro testadas a *Meloidogyne javanica*, segundo Hadisoeganda & Sasser (1982).

Cultivar	EI	Resistência
Aintree	4,8	S
Bencanta	3,4	MR
Bragança	4,4	S
Feijão de 7 Anos	5,0	S
Oriente	4,8	S
Snowstorm	5,0	S
Tarrestre	5,0	S
Vagem Rajada	4,8	S
White Emergo Snowy	4,4	S

EI – índice de massas de ovos

Considerando as duas espécies de feijoeiro analisadas, *P. coccineus* e *P. vulgaris*, verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as cultivares das duas espécies.

Discussão

IV. Discussão

Da análise dos resultados em geral, pode inferir-se que o feijoeiro, quer *Phaseolus vulgaris* quer *P. coccineus*, será uma cultura suscetível a *M. javanica*. Assim, estes resultados vêm, na sua globalidade, apoiar o que foi já sugerido anteriormente sobre a suscetibilidade de várias cultivares de *P. vulgaris* a uma vasta gama de espécies de *Meloidogyne* (Mullin *et al.*, 1991c). No entanto, duas das cultivares avaliadas no presente estudo, Bencanta e Oriente, mostraram níveis de tolerância significativos a *M. javanica*. As restantes cultivares testadas sofreram danos nas raízes e houve um aumento populacional do nemátode, em relação ao nível de inóculo inicial (Tabela VII).

De acordo com Carneiro *et al.* (1999), seria expectável que as raízes das plantas inoculadas com *M. javanica* apresentassem um peso fresco superior ao das plantas testemunhas. Este efeito poderá estar relacionado com a formação de galhas e consequente alteração da fisiologia da raiz (Carneiro *et al.*, 1999; Abrão & Mazzafera, 2001). No entanto, tal não se verificou no presente trabalho, mesmo no caso da cv. Snowstorm que registou o maior número de galhas (Fig. 3); pelo contrário, verificou-se uma tendência para um maior peso radicular das plantas testemunha, em sete das nove cultivares testadas. As cultivares inoculadas poderão ter produzido menos raízes secundárias, o que iria reduzir o número de ápices radiculares disponíveis para a infeção pelo nemátode. Como foram observadas em geral galhas pequenas, a formação de galhas radiculares poderá não ter tido um efeito no peso da raiz superior ao efeito nefasto da infeção pelos nemátodes. Assim, o maior peso radicular nas plantas testemunha (significativo para as cvs. Snowstorm, White Emergo Snowy e Vagem Rajada) poderá estar relacionado com o melhor estado fitossanitário dessas plantas. O peso radicular foi maior nas plantas inoculadas apenas no caso das cultivares Aintree e Oriente.

A presença de galhas nas raízes, uma indicação de que *M. javanica* infetou efetivamente os tecidos radiculares, representa danos nas plantas hospedeiras. Contudo, a formação de galhas nem sempre implica que os nemátodes se tenham reproduzido e, inversamente, a reprodução pode ocorrer sem induzir aumento do volume dos tecidos da planta (Wesemael & Moens, 2012). As cultivares Aintree, Snowstorm, Tarrestre e Vagem

Rajada apresentaram raízes muito danificadas pela presença do nemátode, dado o número elevado de galhas observadas. Estes resultados corroboram um estudo conduzido por Veech & Endo (1970), o que sugere que a cultivar Bencanta foi a mais resistente à infecção por *M. javanica*, com um valor de GI de 3,2. No entanto, tanto a cultivar Bencanta como a Oriente, esta com um valor de GI de 4,2, foram consideradas hipersuscetíveis a *M. javanica* no presente trabalho. Num estudo anterior foi referido que a produção de massas de ovos de NGR em algumas cultivares de feijoeiro era tão lenta, que os nemátodes não conseguiam completar o seu ciclo de vida durante o ciclo da cultura na estufa, apesar de serem visíveis galhas nas raízes (Wesemael & Moens, 2012). De acordo com Lopes (2009), um menor número de galhas pode também indicar um desenvolvimento anormal dos jovens de segundo estágio, possivelmente com baixa taxa de fecundidade e, conseqüentemente, formando poucas galhas e massas de ovos.

Tendo um maior número de galhas, seria de esperar que as raízes das cultivares Aintree e Snowstorm suportassem, também, um maior número de massas de ovos que as outras cultivares. No entanto, o maior número de massas de ovos foi observado nas raízes da cultivar Tarrestre. No caso da cultivar White Emergo Snowy, os nemátodes não tiveram tanta facilidade em reproduzir-se, dado o menor número de massas de ovos presentes nas raízes. Estudos anteriores classificaram cultivares de feijoeiro como resistentes quando suportavam um número igual ou inferior a 12 massas de ovos por sistema radicular, o que sugere que a cultivar White Emergo Snowy seria, também, potencialmente tolerante à infecção por *M. javanica* (Omweha *et al.*, 1990a). A cultivar Bencanta apresentou um número médio de massas de ovos por sistema radicular próximo de 12, o que pode denotar alguma resistência à reprodução do nemátode. Curiosamente, o peso fresco do sistema radicular da cultivar White Emergo Snowy foi 8 vezes superior ao da cultivar Bencanta. Assim, deverá aplicar-se esta linha de corte de 12 massas de ovos sugerida com cuidado, tendo em conta que o desenvolvimento e crescimento radicular das várias espécies e cultivares é condicionado por muitos fatores. Neste trabalho, embora todas as plantas avaliadas fossem feijoeiros, a espécie *P. coccineus* teve sempre uma raiz bastante maior do que a de *P. vulgaris*, o que tem aliás motivado a sua utilização como potencial porta-enxerto. Ainda de acordo com os resultados obtidos por Omweha *et al.* (1990a), todas as outras cultivares testadas neste trabalho seriam consideradas suscetíveis a *M. javanica*.

Nas cultivares Aintree, Snowstorm e Tarrestre foi produzido um número médio de ovos por sistema radicular muito elevado, ou seja, os nemátodes invadiram as raízes, estabelecendo-se e reproduzindo-se nesses tecidos, o que também foi relatado para outras cultivares de feijoeiro e com outras espécies de NGR (Sydenham *et al.*, 1996). A cultivar Bencanta conseguiu limitar, de alguma forma, a produção de ovos nas suas raízes, o que se traduziu num baixo número médio de ovos produzidos.

O número de ovos por grama de raiz é um critério utilizado para avaliar a resistência de cultivares de feijoeiro a *M. incognita* (Ferreira *et al.*, 2010). O número de ovos por grama de raiz reflete melhor a reprodução do nemátode no hospedeiro, ao levar em conta a massa fresca de raiz que estará a suportar o desenvolvimento e reprodução do nemátode. Embora tenha sido produzido o menor número de ovos por grama de raiz na cultivar White Emergo Snowy no presente trabalho, as cultivares Bencanta e Oriente foram as que apresentaram maior grau de resistência ao nemátode, o que é evidenciado pelos baixos valores de RI obtidos (4 e 5%, respetivamente). Isto poderá ser explicado pelo facto de a cultivar White Emergo Snowy ter tido um peso radicular médio relativamente inferior, em relação ao das cultivares Bencanta e Oriente.

De acordo com a classificação de resistência pelo EI, de Hadisoeganda & Sasser (1982), todas as cultivares testadas foram consideradas suscetíveis a *M. javanica*, com a exceção da cultivar Bencanta, que foi moderadamente resistente.

Tendo demonstrado a mais elevada eficiência como planta hospedeira de todas as cultivares testadas, sendo comparável aos valores de Rf do tomateiro (Ferreira, 2009; Maleita *et al.*, 2012; Salata *et al.*, 2012), a cultivar Snowstorm foi escolhida como referência da espécie *P. coccineus* para o cálculo do RI. No caso da espécie *P. vulgaris*, foi escolhida a cultivar Tarrestre como referência para o cálculo do RI, pelos mesmos motivos. Assim, de acordo com a classificação de Taylor & Sasser (1978), e atendendo aos valores de RI, constantes da Tabela V, as cultivares Aintree, Snowstorm e Tarrestre foram consideradas suscetíveis. Por outro lado, as cultivares Feijão de 7 Anos e Vagem Rajada foram consideradas pouco resistentes, enquanto as cultivares Bragançano e White Emergo Snowy foram moderadamente resistentes. Apenas as cultivares Bencanta e Oriente foram consideradas muito resistentes a *M. javanica*, com base nesta classificação. Resultados semelhantes foram obtidos por Ferreira *et al.* (2010), embora tenham sido usadas cultivares de feijoeiro diferentes.

Embora as classificações de Taylor & Sasser (1978) e de Hadisoeganda & Sasser (1982) não sejam consensuais, são indicativas do potencial de resistência e foram usadas no presente estudo para confrontar de diversas formas os graus de resistência obtidos para cada cultivar. De acordo com o sistema de avaliação da resistência e tolerância já mais recente, de Sasser *et al.* (1984), que classifica o grau de resistência com base na reação da planta (danos) e na eficácia reprodutora do nemátode, as cultivares Aintree, Bragançano, Feijão de 7 Anos, Snowstorm, Tarrestre, Vagem Rajada e White Emergo Snowy mostraram ser hospedeiras suscetíveis a *M. javanica*, dado o aumento populacional de nemátodes em relação ao número inicial, o que é evidenciado pelos valores de Rf superiores a 1, resultados semelhantes aos obtidos por outros autores (Santo & Ponti, 1985; Moura & Régis, 1987; Sharma, 2005; Di Vito *et al.*, 2007; Juliatti *et al.*, 2010; Baida *et al.*, 2011). As cultivares Bencanta e Oriente apresentaram os valores de Rf mais baixos, sendo consideradas hipersuscetíveis pelo sistema de classificação de Sasser *et al.* (1984), como mostra a Tabela VI. No entanto, é de sublinhar que a classificação de resistência ou tolerância diz sempre respeito ao binómio cultivar-nemátode. De facto, a cultivar Bencanta foi já referida como um hospedeiro suscetível a outra espécie de NGR, *M. megadora* (Almeida & Santos, 2002).

O próprio tecido radicular de feijoeiro poderá conter os fatores condicionantes da resistência à formação de galhas, induzidas por *M. incognita* (Fassuliotis & Deakin, 1973; Mullin *et al.*, 1991a). Vários investigadores têm tentado perceber se a suscetibilidade ou resistência das raízes a espécies de *Meloidogyne* se correlaciona com a suscetibilidade ou resistência do ápice radicular. Estes estudos indicaram que é o caso em tomateiro e tabaco, mas aparentemente não em feijoeiro (Riggs & Winstead, 1959; Powell & Moore, 1961; Fassuliotis & Deakin, 1973). No presente trabalho, todas as cultivares analisadas sofreram danos nas raízes, resultantes da invasão de *M. javanica*, como mostram os valores de GI superiores a 2 constantes da Tabela VI. Portanto, as nove cultivares de feijoeiro testadas foram todas afetadas por *M. javanica*, independentemente da espécie, pelo que este fator não parece ter tido grande relevância na eficiência do hospedeiro e no seu grau de resistência. Contudo, os resultados obtidos sugerem a hipótese de duas das cultivares analisadas poderem ter genes de resistência, embora a sua expressão seja sempre influenciada pelo meio abiótico, pelo que nem sempre a planta tem os mesmos níveis de resistência aos nemátodes (Omwega *et al.*, 1990a; Omwega & Roberts, 1992).

De acordo com vários autores, os porta-enxertos podem ser utilizados como alternativa aos nematocidas no controle de NGR (Mullin *et al.*, 1991a; Santos *et al.*, 2002; Braga *et al.*, 2004; Amin & Mona, 2014). Salata *et al.* (2012) relatou ainda que, mesmo que os fatores de reprodução dos nemátodes *M. javanica* e *M. incognita* sejam baixos em plantas enxertadas, o cultivo sucessivo na mesma área poderá levar a um aumento da população. No presente trabalho, as cultivares da espécie *P. coccineus* (Aintree, Feijão de 7 Anos, Snowstorm e White Emergo Snowy) apresentaram sistemas radiculares extensos, embora tenham sido consideradas suscetíveis a *M. javanica*. É de salientar que duas das cultivares da espécie *P. coccineus* (Aintree e White Emergo Snowy) têm sido usadas por viveiristas como porta-enxertos. Por outro lado, embora uma combinação bem-sucedida de enxerto e porta-enxerto possa potencializar a tolerância aos NGR, muitos porta-enxertos em uso poderão ser completamente suscetíveis, mas por terem sistemas radiculares extensos, conseguem mitigar os danos causados às raízes comportando-se como tolerantes (Giannakou & Karpouzias, 2003).

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho mostram algum grau de resistência nas cultivares Bencanta e Oriente, sendo esta última uma das cultivares comerciais mais usadas. Seria do maior interesse uma investigação mais aprofundada para testar e avaliar a viabilidade da sua utilização na enxertia de feijoeiro, em condições controladas e no campo, onde estarão expostas a inúmeros fatores bióticos e abióticos capazes de modular a sua reação a pragas e doenças. É de salientar que as cultivares da espécie *P. coccineus* avaliadas, que incluem uma cultivar regional e três cultivares comerciais e que têm sido alvo de alguns testes em viveiro para avaliar o seu potencial como porta-enxerto, não se comportaram como resistentes ou tolerantes a *M. javanica*, um dos NGR mais amplamente distribuídos. Não se justifica, portanto, enxertar cultivares comerciais (como Oriente) ou cultivares nacionais melhoradas (como Bencanta) em porta-enxertos de *P. coccineus* para cultivo em zonas infestadas com NGR, sem antes testar-se a sua resistência ou tolerância a estes nemátodes. Dos resultados obtidos sublinha-se também não ter sido encontrada nenhuma correspondência entre as categorias de cultivares avaliadas (L1 a L3), não parecendo haver uma maior adaptação de cultivares regionais aos nemátodes testados. Por último, na escolha de uma cultivar (ou linhagem melhorada a partir desta) para utilização como porta-enxerto, deverá ser tida em conta não só a sua reação a NGR, mas também a outros agentes patogénicos; como indicado anteriormente, o feijoeiro é suscetível a várias pragas e doenças que limitam a produção.

Considerações Finais

V. Considerações Finais

Os resultados deste trabalho mostraram diferenças significativas entre as cultivares de feijoeiro, na sua resposta a *M. javanica*.

As cultivares Bencanta e Oriente apresentaram-se como moderadamente resistentes e tolerantes a esta espécie de NGR. Estas cultivares sofreram menos danos pelo nemátode e limitaram a sua reprodução, em comparação com as outras cultivares suscetíveis avaliadas. Assim, o uso de cultivares com resistência moderada em áreas fortemente infestadas com *M. javanica* poderia ajudar a reduzir a reprodução do nemátode o suficiente para afetar a sua densidade populacional, dado que o cultivo contínuo de cultivares suscetíveis tem tendência a exacerbar o problema. Não sendo cultivares totalmente resistentes, considera-se que poderão permitir a manutenção de nemátodes em baixos níveis populacionais no campo, não criando um vazio ecológico que possa ser explorado por outros nemátodes.

De acordo com os parâmetros analisados e resultados obtidos, pode salientar-se que as cultivares Bencanta e Oriente apresentaram resultados promissores em relação à sua utilização na enxertia de hortícolas, justificando-se uma investigação mais aprofundada para testar e avaliar a viabilidade da sua utilização na enxertia de feijoeiro, em condições controladas e no campo.

Deverão ser realizados ensaios com mais cultivares de feijoeiro e relativamente a outras espécies do género *Meloidogyne*, estabelecidas em Portugal, tentando-se encontrar cultivares realmente resistentes, que possam vir a ser aconselhadas como porta-enxertos comerciais.

Referências Bibliográficas

VI. Referências Bibliográficas

- Abawi, G.S. & Varon De Agudelo, F. (1989). Nematodes. In: *Bean production problems in the tropics* (433–454). Cali, Colombia: CIAT.
- Abrantes, I.M. de O. & Santos, M.S.N. de A. (1991). *Meloidogyne lusitanica* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing olive tree (*Olea europaea* L.). *Journal of Nematology*, 23: 210–224.
- Abrantes, I.M. de O., Vieira dos Santos, M.C., da Conceição, I.L.P.M., de A. Santos M.S.N. & Vovlas, N. (2008). Root-knot and other plant-parasitic nematodes associated with fig trees in Portugal. *Nematologia Mediterranea*, 36: 131–136.
- Abrão, M.M. & Mazzafera, P. (2001). Efeitos do nível de inóculo de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. *Bragantia*, 60: 19–26.
- Almeida, A.M.S.F. de & Santos, M.S.N. de A. (2002). Resistance and host-response of selected plants to *Meloidogyne megadora*. *Journal of Nematology*, 34: 140–142.
- Almeida, D. (2006). Feijão-verde e outros *Phaseolus*. In: *Manual de Culturas Hortícolas – Volume II* (247–270). Lisboa, Portugal: Editorial Presença
- Amin, A.W. & Mona, A.W. (2014). Protecting cucumber from *Meloidogyne incognita* using graft onto resistant cucurbit rootstocks and antagonistic marigold as an alternative to nematicide. *Pakistan Journal of Nematology*, 32(1): 51–58.
- Anuário Agrícola – Informação de Mercados (2014), Gabinete de Planeamento e Políticas. Acedido a 11 de novembro de 2015, em http://www.gpp.pt/pbl/period/AnuarioAgricola_2013.pdf.
- Baida, F.C., Santiago, D.C., Takahashi, L.S.A., Athanázio, J.C., Stroze, C.T. & Arieira, G.O. (2011). Host suitability of snap bean (*Phaseolus vulgaris*) strains to *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. *Nematropica*, 41: 62–67.
- Barker, K.R. & Koenning, S.R. (1998). Developing sustainable systems for nematode management, *Annual Review of Phytopathology*, 36: 165–205.

- Barker, K.R., Carter, C. & Sasser, J. (1985). Nematode Extraction and Bioassays. In: *An Advanced Treatise on Meloidogyne Volume 2: Methodology* (19–35). Raleigh, U.S.A.: North Carolina State University Graphics.
- Barrett, C.E., Zhao, X. & Hodges, A.W. (2012). Cost benefit analysis of using grafted transplants for root-knot nematode management in organic heirloom tomato production. *HortTechnology*, 22: 252–257.
- Beninger, C.W. & Hosfield, G.L. (2003). Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7879–7883.
- Bernard, E.C. (1992). Soil nematode biodiversity. *Biology and Fertility of Soils*, 14: 99–103.
- Berry, S.D., Fargette, M., Spaull, V.W., Morand, S. & Cadet, P. (2008). Detection and quantification of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*), lesion nematode (*Pratylenchus zaei*) and dagger nematode (*Xiphinema elongatum*) parasites of sugarcane using real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 22: 168–176.
- Bird, D.M. & Opperman, C.H. (1998). *Caenorhabditis elegans*: A genetic guide to parasitic nematode biology. *Journal of Nematology*, 30: 299–308.
- Blaxter, M. (2011). Nematodes: the worm and its relatives. *PLoS Biology*, 9: 1–9.
- Boag, B. & Yeates, G.W. (1998). Soil nematode biodiversity in terrestrial ecosystems. *Biodiversity and Conservation*, 7: 617–630.
- Bongers, T. (1990). The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia*, 83: 14–19.
- Braga, R., Nunes, D.R.R., Almeida, C.A., Bom, V.P., Gioria, R., Santos, H.S. & Goto, R. (2004). Avaliação de porta-enxertos de pimentão para o controle de nematóides em cultivos sob ambiente protegido. *Horticultura Brasileira*, Suplemento 2, 22: 445.
- Brandão, J., Goto, R., Guimarães, V., Habermann, G., Rodrigues, J. & Callegari, O. (2003). Influência da enxertia nas trocas gasosas de dois híbridos de berinjela cultivados em ambiente protegido. *Horticultura Brasileira*, 21: 474–477.

- Brickell, C.D., Alexander, C., David, J.C., Hettterscheid, W.L.A., Leslie, A.C., Malecot, V., Jin, X. & Cubey, J.J. (2009). Definitions: Cultivar. In: *International Code of Nomenclature for Cultivated Plants* (8th Edition) (6–10). Leuven: ISHS.
- Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil*, 252: 55–128.
- C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 282: 2012–2018.
- Cadet P. & Spaul V.W (2003). Effect of nematodes on the sustained production of sugarcane in South Africa. *Field Crops Research*, 83: 91–100.
- Canto-Saenz, M. (1983). The nature of resistance to *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White 1919) Chitwood 1949. In: *Proceedings, Third Research and Planning Conference on Root-Knot Nematodes, Meloidogyne spp.* (160–165). March 22-26, 1982, C. C. Carter (Ed), International Meloidogyne Project. Lima, Peru: North Carolina University Graphics.
- Carneiro, R.G., Mazzafera, P. & Ferraz, L.C.C.B. (1999). Carbon partitioning in soybean infected with *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. *Journal of Nematology*, 31: 348–355.
- Castagnone-Sereno, P. & Danchin, E.G.J. (2014). Parasitic success without sex – the nematode experience. *Journal of Evolutionary Biology*, 27: 1323–1333.
- Chitwood, B.G. & Chitwood, M.B. (1937). *An Introduction to Nematology*. Baltimore, MD: Monumental Printing.
- Chitwood, B.G. (1949). Root-knot nematodes – Part I, A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 16: 90–104.
- Conceição, I.L.P.M. da, Cunha, M.J.M. da, Feio, G., Correia, M., Vieira dos Santos, M.C., Abrantes, I.M. de O. & Santos, M.S.N. de A. (2009). Root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., on potato in Portugal. *Nematology*, 11: 311-313.
- Cook, R. & Evans, K. (1987). Resistance and tolerance, In: *Principles and Practice of Nematode Control in Crops* (179-231). New York, U.S.A.: Academic Press.

Costa, S.R. (2015). Ecologia de nemátodes e seu interesse na enxertia de plantas hortícolas. In: *Agrotec – Revista técnico-científica agrícola*, 14: 28–30.

Coyne, D.L., Nicol, J.M. & Claudius-Cole, B. (2007). *Nematologia prática: Um guia de campo e de laboratório*. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou: Benin.

Decraemer, W. & Hunt, D.J. (2006). Structure and classification. In: R.N., Perry & M. Moens (Eds.), *Plant Nematology* (3–32). Wallingford, Oxfordshire: CAB International.

DeVay, J.E. (1991). Historical review and principles of soil solarization. In: J.E., DeVay, J.J., Stapleton & C.L., Elmore (Eds.), *Soil Solarization*. FAO, Rome.

Di Vito, M., Parisi, B. & Catalano, F. (2007). Pathogenicity of *Meloidogyne javanica* on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in pots. *Nematropica*, 37: 339–344.

Dinelli, G., Bonetti, A., Minelli, M., Marotti, I., Catizone, P. & Mazzanti, A. (2006). Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes. *Food Chemistry*, 99: 105–114.

Diretiva 2000/29/CE do Conselho da União Europeia, de 8 de Maio de 2000, relativa às medidas de proteção contra a introdução na Comunidade de organismos prejudiciais aos vegetais e produtos vegetais, e contra a sua propagação no interior da Comunidade. Acedido a 15 de setembro de 2015, em http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/ph_ps/harm/legal/dir00_29_pt.pdf.

Diretiva 2009/7/CE da Comissão Europeia, de 10 de Fevereiro de 2009, que altera os anexos I, II, IV e V da Diretiva 2000/29/CE do Conselho, relativa às medidas de proteção contra a introdução na Comunidade de organismos prejudiciais aos vegetais e produtos vegetais, e contra a sua propagação no interior da Comunidade. Acedido a 15 de setembro de 2015, em <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=celex:32009L0007>.

Dropkin, V.H. (1969). The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. *Phytopathology*, 59: 1632–1637.

- Eisenback, J.D. & Triantaphyllou, H.H. (1991). Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: *Manual of Agricultural Nematology* (191–274). New York, USA: Marcel Dekker Inc.
- Ettema, C.H. & Bongers, T. (1993). Characterization of nematode colonization and succession in disturbed soil using the Maturity Index. *Biology and Fertility of Soils*, 16: 79–85.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. 2007. Acedido a 10 de setembro de 2015, em <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.
- Fassuliotis, G. & Deakin, J.R. (1973). Stem galls on root-knot nematode resistant snap beans. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 98: 425–427.
- Ferraz, L.C.C.B., Asmus, G.L., Carneiro, R.G., Mazaffera, P. & Silva, J.F.V. (2001). As Meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro, *Relações Parasito-Hospedeiro nas Meloidoginoses da Soja*, 15–38.
- Ferreira, S. (2009). *Resistência de cultivares de feijão e feijão-vagem aos nematóides das galhas*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Brasil.
- Ferreira, S., Gomes, L.A.A., Maluf, W.R., Campos, V.P., Carvalho Filho, J.L.S. de & Santos, D.C. (2010). Resistance of Dry Bean and Snap Bean Cultivars to Root-knot Nematodes. *HortScience*, 45: 320–322.
- Ferris, H., Venette, R.C. & Scow, K.M. (2004). Soil management to enhance bacterivore and fungivore nematode populations and their nitrogen mineralization function. *Applied Soil Ecology*, 24: 19–35.
- Ferris, H., Venette, R.C., van der Meulen, H.R. & Lau, S.S. (1998). Nitrogen mineralization by bacterial-feeding nematodes: verification and measurement. *Plant and Soil*, 203: 159–171.
- Fierer, N., Strickland, M.S., Liptzin, D., Bradford, M.A. & Cleveland, C.C. (2009). Global patterns in belowground communities. *Ecology Letters*, 12: 1–12.
- France, R.A. & Abawi, G.S. (1994). Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on Selected Bean Genotypes. *Journal of Nematology*, 26: 467–474.

- Giannakou, I.O. & Karpouzas, D.G. (2003). Evaluation of chemical and integrated strategies as alternatives to methyl bromide for the control of root-knot nematodes in Greece. *Pest Management Science*, 59: 883–892.
- Goeldi, E.A. (1892). Relatório sobre a moléstia do cafeeiro na Província do Rio de Janeiro. *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, 8: 7–123.
- González, J. (1999). *Planteles: semilleros, viveros*. Reus: Ediciones de Horticultura.
- Goodey, B., Franklin, M.F. & Hooper, D.J. (1965). *The Nematode Parasites of Plants Classified Under Their Hosts*. Farnham Royal, UK: CAB International.
- Hadisoeganda, W.W. & Sasser, J.N. (1982). Resistance of tomato, bean, southern pea, and garden pea cultivars to root-knot nematodes based on host suitability. *Plant Disease*, 66: 145–150.
- Hagedorn, D.J. & Inglis, D.A. (1986). *Handbook of Bean Diseases*. University of Wisconsin – Extension.
- Hallman, J., Frankenberg, A., Paffrath, A. & Schmidt, H. (2007). Occurrence and importance of plant-parasitic nematodes in organic farming in Germany. *Nematology*, 9: 869–879.
- Hartman, K. (1983). Enhancement technique for egg masses of the root-knot nematode with phloxine B. In: *Proceedings, Third Research and Planning Conference on Root-Knot Nematodes, Meloidogyne spp.* (130). March 22-26, 1982, C. C. Carter (Ed), International Meloidogyne Project. Lima, Peru: North Carolina University Graphics.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T. & Geneve, R.L. (2002). *Plant Propagation: Principles and Practices*. New Jersey, USA: Prentice-Hall.
- Hassell, R., Levi, A., King, S.R. & Zhang, X. (2008). Grafting effects on vegetable quality. *HortScience*, 43: 1670–1671.
- Haynes, C. (2008). Cultivar versus variety. *Horticulture & Home Pest News*, Iowa State University, acessado a 9 de fevereiro de 2015 em <http://www.ipm.iastate.edu/ipm/hortnews/2008/2-6/CultivarOrVariety.html>.

Hodda, M., Bloemers, G.F., Lawton, J.H. & Lamshead, P.J.D. (1997). The effects of clearing and subsequent land-use on abundance and biomass of soil nematodes in tropical forest. *Pedobiologia*, 41: 279–294.

Hooks, C.R.R., Wang, K.H. Ploeg, A. & McSorley, R. (2010). Using marigold (*Tagetes* spp.) as a cover crop to protect crops from plant-parasitic nematodes. *Applied Soil Ecology*, 46: 307–320.

Hugot, J.P., Baujard, P. & Morand, S. (2001). Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, 3: 199–208.

Hunt, D.J. & Handoo, Z.A. (2009). Taxonomy, identification and principal species. In: Perry, R.N., Moens, M. & Starr, J.L. (Eds). *Root-knot nematodes* (55–97). Wallingford, UK: CABI Publishing.

Hussey, R.S. & Barker, K.R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Report*, 57: 1025–1028.

Hussey, R.S. (1985). Host-parasite relationships and associated physiological changes. In: *An Advanced Treatise on Meloidogyne Volume 1: Biology and Control* (143–153). Raleigh, U.S.A.: North Carolina State University Graphics.

Ibrahim, I.K.A. (1985). The status of root-knot nematodes in the Middle East, Region VII of the International Meloidogyne Project. In: Sasser, J.N. & Carter, C.C. (Eds.) *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Vol. I: Biology and Control* (373–378). Raleigh, USA: North Carolina State University Graphics.

Ingham, R.E., Trofymow, J.A., Ingham, E.R. & Coleman, D.C. (1985). Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: Effects on nutrient cycling and plant growth. *Ecological Monographs*, 55: 119–140.

Ioannou, N. (2001). Integrating soil solarization with grafting on resistant rootstocks for management of soil-borne pathogens of eggplant. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 76: 396–401.

Jones, F.G.W. & Jones, M.G. (1964). Plant parasitic nematodes – Nematoda. In: Jones, F.G.W. & Jones, M.G. (Eds.) *Pests of Field Crops* (220–241). London, UK: Edward Arnold Ltd.

- Jones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E.G.J., Gaur, H.S., Helder, J., Jones, M.G.K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J.E., Wesemael, W.M.L. & Perry, R.N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14: 946–961.
- Juliatti, F.C., Walber, R. Santos, M.A. & Sagata, E. (2010). Reação de acessos de feijoeiro a nematóides das galhas. *Bioscience Journal*, 26: 763–769.
- Karssen, G. (2002). *The plant-parasitic nematode genus Meloidogyne Göldi, 1892 (Tylenchida) in Europe*. Brill, Leiden: The Netherlands.
- Karssen, G. (2004). Nieuwe wortelknobbelaaltjes en opvallende waarnemingen in Europa. *Gewasbescherming*, 35: 245–248.
- Katan, J. (1980). Solar pasteurization of soils for disease control: status and prospects. *Plant Disease*, 64: 45–54.
- Kerry, B.R. & Hominick, W.M. (2002). Biological control. In: Lee, D.L. (ed.) *Biology of Nematodes* (483-510). Taylor & Francis, London.
- King, S.R., Davis, A.R., Liu, W. & Levi, A. (2008). Grafting for disease resistance. *HortScience*, 43: 1673–1676.
- Krueger, R. & McSorley, R. (2008). Nematode management in organic agriculture. *University of Florida: IFAS Extension*, 1–9.
- Lee, J.M., Kubota, C., Tsao, S.J., Bie, Z., Hoyos Echevarria, P., Morra, L. & Oda, M. (2010). Current Status of vegetable grafting: Diffusion, grafting techniques, automation. *Scientia Horticulturae*, 127: 93–105.
- Lopes, M.J.C. (2009). *Aspectos histopatológicos e mudança na expressão de genes em genótipos de soja resistente, durante a interação com Meloidogyne javanica*. Dissertação de Doutorado, Departamento de Fisiologia Vegetal – Universidade Federal de Lavras, Brasil.
- Maleita, C.M.N., Curtis, R.H.C., Powers, S.J. & Abrantes, I.M. de O. (2012). Inoculum levels of *Meloidogyne hispanica* and *M. javanica* affect nematode reproduction, and growth of tomato genotypes. *Phytopathologia Mediterranea*, 51: 566–576.

- Maroto-Borrego, J.V. & Miguel, A. (1996). El injerto herbáceo en la sandía (*Citrullus lanatus*) como alternativa a la desinfección química del suelo. *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales*, 11:239–253.
- Moens, M., Perry, R.N. & Starr, J.L. (2009). *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: *Root-Knot Nematodes* (1–17). Wallingford, UK: CAB International.
- Moura, R.M. & Régis, E.M.O (1987). Reações de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* (Nematoda: Heteroderidae). *Nematologia Brasileira*, 11: 215–225.
- Mourão, I. de M. & Brito, L.M. (2014). A enxertia em culturas hortícolas. In: *Agrotec – Revista Técnico-Científica Agrícola*, 12: 43–46.
- Mukhtar, T., Hussain, M.A., Kayani, M.Z. & Aslam, M.N. (2014). Evaluation of resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in okra cultivars. *Crop Protection*, 56: 25–30.
- Mullin, B.A., Abawi, G.S., Pastor-Corrales, M.A. & Kornegay, J.L. (1991a). Contribution of root and shoot tissues of *Phaseolus vulgaris* to *Meloidogyne incognita* resistance. *HortScience*, 26: 1503–1504.
- Mullin, B.A., Abawi, G.S., Pastor-Corrales, M.A. & Kornegay, J.L. (1991b). Root-knot nematodes associated with beans in Colombia and Peru and related yield loss. *Plant Disease*, 75: 1208–1211.
- Mullin, B.A., Abawi, G.S., Pastor-Corrales, M.A. & Kornegay, J.L. (1991c). Reactions of selected bean pure lines and accessions to *Meloidogyne* species. *Plant Disease*, 75: 1212–1216.
- Murata, J. & Ohara, K. (1936). Prevention of watermelon Fusarium wilt by grafting *Lagenaria* [in Japanese]. *Japanese Journal of Phytopathology*, 6: 183–189.
- Neher, D.A. & Campbell, D.L. (1994). Nematode communities and microbial biomass in soils with annual and perennial crops. *Applied Soil Ecology*, 1: 17–28.

- Ngundo, B.W. & Taylor, D.P. (1974). Effects of *Meloidogyne* spp. on bean yields in Kenya. *Plant Disease Reporter*, 58: 1020–1023.
- Nicol, J.M., Turner, S.J., Coyne, D.L., den Nijs, L., Hockland, S. & Maafi, Z.T. (2011). Current nematode threats to world agriculture. In: Jones, J.T., Gheysen, G. & Fenoll, C. (Eds.), *Genomics and Molecular Genetics of Plant–Nematode Interactions* (21–44). Heidelberg: Springer.
- Noling, J.W. (1995). Nematodes and their management, Horticulturas Sciences Department – UF/IFAS Extension, acessado a 17 de março de 2015, em <http://edis.ifas.ufl.edu/cv112>.
- Omweaga, C.O., Thomason, I.J., Roberts, P.A. & Waines, J.G. (1989). Identification of new sources of resistance to root-knot nematodes in *Phaseolus*. *Crop Science*, 29: 1463–1467.
- Omweaga, C.O., Thomason, I.J. & Roberts, P.A. (1990a). A single dominant gene in common bean conferring resistance to three root-knot nematode species. *Phytopathology*, 80: 745–748.
- Omweaga, C.O., Thomason, I.J. & Roberts, P.A. (1990b). Effects of temperature on expression of resistance to *Meloidogyne* spp. in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Nematology*, 22: 446–451.
- Omweaga, C.O. & Roberts, P.A. (1992). Inheritance of resistance to *Meloidogyne* spp. in common bean and the genetic basis of its sensitivity to temperature. *Theoretical and Applied Genetics*, 83: 720–726.
- Peil, R.M. (2003). A enxertia na produção de mudas de hortaliças. *Ciência Rural*, 33(6): 1169–1177.
- Pires, C.V., Oliveira, M.G. de A., Cruz, G.A.D.R., Mendes, F.Q., De Rezende, S.T. & Moreira, M.A. (2005). Composição físico-química de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Alimentos e Nutrição*, 16: 157–162.
- Piskiewicz, A.M., Duyts, H. & van der Putten, W.H. (2008). Multiple species-specific controls of root-feeding nematodes in natural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2729–2735.

Powell, N.T. & Moore, E.L. (1961). A technique for inoculation of leaves with root-knot nematodes. *Phytopathology*, 51: 201–202.

Regulamento (CE) N.º 2037/2000 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Junho de 2000, relativo às substâncias que empobrecem a camada de ozono. Acedido a 17 de setembro de 2015, em <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32000R2037&from=EN>.

Ricardo, C.P.P. & Baeta, J.M.P. (1982). Feijão: Importância agrícola e alimentar. *Revista Ciências Agrárias*, 5: 59–80.

Riggs, R.D. & Winstead, N.N. (1959). Studies on resistance in tomato to root-knot nematodes and the occurrence of pathogenic biotypes. *Phytopathology*, 49: 716–724.

Rodrigues, C.L. (2009). Plantas hortícolas enxertadas. *I Colóquio Nacional de Sementes e Viveiros, Atas Portuguesas de Horticultura*, 15: 80–84.

Romero-Arenas, O., Damián, M.A.H., Rivera, J.A.T., Báez, A.S., Huerta, M.L. & Cabrera, E.H. (2013). The nutritional value of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and its importance for feeding of rural communities in Puebla-Mexico. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2: 59–65.

Salata, A.C., Bertolini, E.V., Magro, F.O., Cardoso, A.I.I. & Wilcken, S.R.S. (2012). Enxertia e sua influencia na produção de pepino e reprodução de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. *Horticultura Brasileira*, 30: 590–594.

Santo, G.S. & Ponti, R.P. (1985). Host suitability and reaction of bean and pea cultivars to *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla*. *Journal of Nematology*, 17: 77–79.

Santos, H.S., Wilcken, S.R.S. & Goto, R. (2002). Reprodução de *Meloidogyne incognita* Raça 2 em diferentes porta-enxertos de pimentão. *Nematologia Brasileira*, 26(2): 209–211.

Sasser, J.N. & Carter, C.C. (1985). Plant-Parasitic Nematodes. In: *An Advanced Treatise on Meloidogyne Volume 1: Biology and Control* (14–53). Raleigh, U.S.A.: North Carolina State University Graphics.

Sasser, J.N., Carter, C.C. & Hartman, K.M. (1984). *Standardization of Host Suitability Studies and Reporting of Resistance to Root-Knot Nematodes*. Raleigh, U.S.A.: North Carolina State University Graphics.

Scheffers, B.R., Joppa, L.N., Pimm, S.L. & Laurance, W.F. (2012). What we know and don't know about Earth's missing biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 27: 501–510.

Sharma, R.D. (2005). Susceptibilidade de genótipos de feijão Mungo Verde aos nematóides *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus* no campo. *Nematologia Brasileira*, 29: 87–89.

Shinohara, Y. (1994). Raising vegetable seedlings. In: *Apostila, Vegetable Crops Production Course*. Faculty of Horticulture – University of Tsukuba, Japan.

Silva, C.I.C.A.V. da (2012). *Nematodocidas botânicos no controlo do nemátode-das-galhas-radiculares, Meloidogyne javanica*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia – Universidade do Minho, Portugal.

Sohlenius, B. (1980). Abundance, biomass and contribution to energy-flow by soil nematodes in terrestrial ecosystems. *Oikos*, 34: 186–194.

Stone, A.R. (1973). *Heterodera pallida* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae), a second species of potato cyst nematode. *Nematologica*, 18: 591–606.

Sydenham, G.M, McSorley, R. & Dunn, R.A. (1996). Effects of resistance in *Phaseolus vulgaris* on development of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 28: 485–491.

Taylor, A.L. & Sasser, J.N. (1978). Breeding plant cultivars for resistance to *Meloidogyne* species. In: *Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne spp.)* (37–106). Raleigh, U.S.A.: North Carolina State University Graphics.

Taylor, A.L. (1967). *Introduction to research on plant nematology: An F.A.O. Guide to the Study and Control of Plant Parasitic Nematodes*. Rome, FAO.

Taylor, L.R., Sasser, J.N. & Nelson, L.A. (1982). Relationships of climate and soil characteristics to geographical distribution of *Meloidogyne* species in agricultural soils.

Cooperative Publication, Department of Plant Pathology, North Carolina State University and US Agency for International Development, Raleigh, North Carolina.

Theodoropoulou, A., Giotis, C., Hunt, J., Gilroy, J., Toufexi, E., Liopa-Tsakalidis, A., Markellou, A., Lueck, L., Seal, C. & Leifert, C. (2007). Effect of variety choice and use of resistant rootstock on crop yield and quality parameters of tomato plants grown in organic, low input and conventional production systems/growth media. 3rd QLIF Congress: Improving Sustainability in Organic and Low Input Food Production Systems, University of Hohenheim, Germany.

Triantaphyllou, A.C. & Hirschmann, H. (1959). Development and sex determination in *Meloidogyne incognita* and intersexuality in *M. javanica*. *Phytopathology*, 49: 552–553.

Triantaphyllou, A.C. (1973). Environmental sex differentiation of nematodes in relation to pest management. *Annual Review of Phytopathology*, 11: 441–462.

Trudgill, D.L. (1995). An assessment of the relevance of thermal time relationships to nematology. *Fundamental and Applied Nematology*, 18: 407–417.

Trudgill, D.L. (1997). Parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.); how can these biotrophic endoparasites have such an enormous host range?. *Plant Pathology*, 46: 26–32.

Trudgill, D.L. & Blok, V.C. (2001). Apomitic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 53–77.

Trudgill, D.L., Bolla, G., Blok, V.C., Daudi, A., Davies, K.G., Gowen, S.R., Fargette, M., Madulu, J.D., Mateille, T., Mwangeni, W., Netscher, C., Phillips, M.S., Sawadogo, A., Trivino, C.G. & Voyoukallou, E. (2000). The importance of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and factors affecting the utility of *Pasteuria penetrans* as a biocontrol agent. *Nematologica*, 2: 823–845.

Trudgill, D.L., Honek, A., Li, D. & Van Straalen, N.M. (2005). Thermal time – concepts and utility. *Annals of Applied Biology*, 146: 1–14.

Tyler, J. (1933). Development of the root-knot nematode as affected by temperature. *Hilgardia*, 7: 391–413.

- Van Valen, L. (1976). The Red Queen. *The American Naturalist*, 110: 809–810.
- Veech, J.A. & Endo, B.Y. (1970). Comparative morphology and enzyme histochemistry of root-knot resistance and susceptible soybean. *Phytopathology*, 60: 896–902.
- Verdejo-Lucas, S., Blanco, M., Cortada, L. & Sorribas, F.J. (2013). Resistance of tomato rootstocks to *Meloidogyne arenaria* and *Meloidogyne javanica* under intermittent elevated soil temperatures above 28 °C. *Crop Protection*, 46: 57–62.
- Wander, A.E., Gazzola, R., Gazzola, J., Ricardo, T.R. & Garagorry, F.L. (2007). Evolução da produção e do mercado mundial do feijão. In: *XLV Congresso da SOBER: Conhecimento para Agricultura do Futuro*, 25-27 Jul. 2007.
- Wesemael, W.M.L. & Moens, M. (2012). Screening of common bean (*Phaseolus vulgaris*) for resistance against temperate root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Pest Management Science*, 68: 702–708.
- Wesemael, W.M.L., Viaene, N. & Moens, M. (2011). Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. *Nematology*, 13: 3–16.
- Whitehead, A.G. (1997). *Plant Nematode Control* (1–12). New York, USA: CABI Publishing.
- Williamson, V.M. (1998). Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 277–293.
- Yeates, G.W. (1979). Soil nematodes in terrestrial ecosystems. *Journal of Nematology*, 11: 213–229.
- Yeates, G.W., Bongers, T., de Goede, R.G.M., Freckman, D.W. & Georgieva, S.S. (1993). Feeding habits in soil nematode families and genera – an outline for soil ecologists. *Journal of Nematology*, 25: 315–331.
- Yeates, G.W., Ferris, H., Moens, T., & van der Putten, W.H. (2009). The role of nematodes in ecosystems. In: M. Wilson & T. Kakouli-Duarte (Eds.), *Nematodes as Environmental Indicators* (1–44). Wallingford, U.K.: CABI.

Zasada, I.A., Halbrendt, J.M., Kokalis-Burelle, N., LaMondia, J., McKenry, M.V. & Noling, J.W. (2010). Managing nematodes without methyl bromide. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 311–328.