



2015



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Efeito de extratos de *Solanum*
sisymbriifolium na eclosão e mortalidade de
isolados de nemátodes-de-quisto da
batateira, *Globodera* spp.**

Efeito de extratos de *Solanum sisymbriifolium* na eclosão e mortalidade de isolados
de nemátodes-de-quisto da batateira, *Globodera* spp

Cecilia Cardoso

Cecilia Ferreira Cardoso

2015



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Efeito de extratos de *Solanum sisymbriifolium* na eclosão e mortalidade de isolados de nemátodes-de-quisto da batateira, *Globodera* spp.

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

Cecilia Ferreira Cardoso

2015

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



A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales. If I see anything vital around me, it is precisely that spirit of adventure, which seems indestructible and is akin to curiosity.

Marie Curie, A Biography (1937).

Agradecimentos

Para começar agradeço aos meus pais, por todos os sacrifícios e pela dedicação, e porque sem eles eu não estaria aqui. À minha mãe, por toda a força, encorajamento e apoio. Por todos os valores que me inculuiu, e por ser um pilar na minha vida, obrigada.

Ao meu pai, não tenho palavras para descrever o tamanho do meu amor e gratidão.

Agradeço às minhas orientadoras, pela ajuda disponibilizada ao longo do curso, pela atenção, paciência e encorajamento durante todo este período... muito obrigada. À Doutora Isabel Luci Pisa Mata da Conceição, por toda a ajuda, amabilidade e incentivo demonstrados desde o primeiro dia do mestrado, até agora. À Doutora Maria Teresa Batista, pelo tempo dispensado, pelos conselhos e puxões de orelha, que me permitiram reavaliar-me constantemente e evoluir profissionalmente. Obrigada por tudo, são uma referência para mim, a imagem daquilo que quero ser no futuro.

Não podia deixar de mencionar aqui os colegas de laboratório, especialmente a Margarida Dias e a Soraia Perpétuo, obrigada por toda ajuda que me ofereceram e pelos conhecimentos que me transmitiram desde o início. Agradeço também ao Gustavo Costa, pela simpatia e paciência que demonstrou todas as vezes que lhe pedi ajuda. Pelos mesmos motivos, agradeço sinceramente à Carla Maleita, à Clara Santos, à Aida, à Ivânia e ao Luis.

Agradeço também aos meus irmãos, Vanessa, Hugo, Eva, por existirem e me trazerem luz nos momentos de escuridão. À minha tia Aida, pela sua presença na minha vida, aos meus avós, e o resto da família que eu estimo acima de tudo, pela alegria que me trazem diariamente. À minha família francesa, por todo o amor, carinho e apoio.

Finalmente, aos amigos que me apoiaram nesta fase, eles sabem quem são.

Índice

Resumo	v
Abstract	vi
Introdução	1
Material e métodos	15
1. Obtenção de exsudato de <i>Solanum tuberosum</i> (cv. Desirée)	16
2. Obtenção de quistos de <i>Globodera</i>	16
3. Obtenção das plantas e preparação dos extratos de <i>Solanum sisymbriifolium</i>	16
4. Realização dos testes de eclosão	17
<i>Globodera pallida</i>	17
<i>Globodera rostochiensis</i>	19
4.1 Contagem dos J2 eclodidos	20
5. Realização dos testes de mortalidade	21
<i>Globodera pallida</i> e <i>G. rostochiensis</i>	21
5.1 Contagem dos J2 mortos	21
6. Fracionamento dos extratos com maior atividade	23
6.1 Determinação das melhores condições para o fracionamento	23
6.2 Fracionamento dos extratos por cromatografia em coluna	24
7. Pesquisa de saponinas em <i>Solanum sisymbriifolium</i>	27
Resultados	29
1. Testes de eclosão	30
1.1 Avaliação da atividade dos extrato	30
<i>Globodera pallida</i>	30
<i>Globodera rostochiensis</i>	32
1.2 Avaliação da atividade das frações	35
<i>Globodera pallida</i>	35
<i>Globodera rostochiensis</i>	39
2. Testes de mortalidade	42

<i>Globodera pallida</i>	42
<i>Globodera rostochiensis</i>	43
3. Pesquisa de saponinas nos extratos S1M, S2M, PA1M e R1M	45
Discussão	49
Considerações finais e perspectivas futuras	54
Bibliografia	57

Resumo

Os nemátodes-de-quisto da batateira, *Globodera* spp., são uma grave restrição à produção agrícola e tem aumentado a necessidade de descobrir nematodocidas ecológicos e eficazes. A planta *Solanum sisymbriifolium*, utilizada como cultura armadilha, é uma importante solução alternativa ao possuir compostos naturais que podem ser utilizados como modelo para um produto químico sintético.

Neste trabalho foi avaliado o efeito de *S. sisymbriifolium* (cv. Sis 6001) na eclosão de jovens do segundo estágio (J2) de *G. pallida* e *G. rostochiensis*, e estudadas as diferenças entre duas partes distintas da planta (parte aérea e raiz) e do solo onde a planta se desenvolveu. Também foram analisadas as diferenças de eclosão utilizando 3 idades diferentes da planta (1, 2 e 3 meses). Depois de determinar o extrato mais eficaz em induzir eclosão, que de acordo com os resultados dos testes foi o extrato de solo, procedeu-se a um fracionamento dos seus fitoconstituintes, por cromatografia em coluna e analisou-se a capacidade de eclosão de cada fração de modo a inferir o tipo de compostos que mais contribuem para este efeito. Uma das frações destacou-se na eclosão, para cada espécie (FC para *G. pallida* e FC' para *G. rostochiensis*). Por outro lado, foi averiguada a capacidade nematodocida de *S. sisymbriifolium* através da realização de testes de mortalidade, utilizando os mesmos extratos testados para a eclosão, sendo também testadas as frações resultantes do processo cromatográfico. Neste estudo não foram observados efeitos na mortalidade de *Globodera* spp, sugerindo que os extratos e frações da planta que foram testados não possuem acção nematodocida direta nestes nemátodes.

Para além deste estudo, obteve-se, por cromatografia em camada fina, o perfil fitoquímico de *S. sisymbriifolium*, que evidenciou a presença de saponinas na planta, em cada uma das duas partes analisadas, as quais não parece contribuírem para a propriedades de eclosão. De um modo geral, este trabalho permitiu aprofundar o conhecimento sobre os efeitos da *S. sisymbriifolium* nos nemátodes-de-quisto da batateira, com vista a contribuir para o desenvolvimento de estratégias de combate vantajosas e não prejudiciais para o meio ambiente, alternativa aos métodos que já são aplicados.

Palavras-chave: Nemátodes-de-quisto da batateira, saponinas, testes de eclosão, exsudatos radiculares, testes de mortalidade, fracionamento, *Solanum sisymbriifolium*.

Abstract

Potato cyst nematodes, *Globodera* spp., are a serious constraint to agricultural production and the need to find environmentally friendly and effective nematicides is increasing. The plant *Solanum sisymbriifolium*, used as a trap crop, is an important alternative solution by having natural compounds which may be used as a model for a synthetic chemical.

The objectives of this study were to analyze if *S. sisymbriifolium* (cv. Sis 6001) induces hatching on second-stage juveniles (J2) of *G. pallida* and *G. rostochiensis*, and evaluate the differences between two parts of the plant (aerial parts and roots) and soil where the plant has grown. The differences on hatching using three different ages of the plant (1, 2 and 3 months) were also analysed. After determining the most effective extract to induce eclosion, which according to the results was soil extract, the fractionation of their phytochemicals were obtained by column chromatography. Also, the hatching ability of each fraction was determined in order to infer the type compounds that contributed most to a possible nematicide effect. One of the fractions excelled on hatching, for each species (FC for *G. pallida* and FC' for *G. rostochiensis*). Moreover, it was examined whether nematicidal activity of *S. sisymbriifolium* through the realization of mortality tests using the same extracts tested for hatching, and it was also tested the chromatographic fractions resulting from the chromatographic process. The mortality of *Globodera* spp. was not affected by any of the extracts or fractions tested, suggesting these do not have a direct nematicidal effect on these nematodes.

Furthermore, the phytochemical profiles of the different *S. sisymbriifolium* parts were obtained by thin layer chromatography and the analysis of the cromatograms revelead the presence of saponins in all plant parts tested, which does not seem to contribute to the hatching properties. This study contributed to increase knowledge about the effects of *S. sisymbriifolium* on potato cyst nematodes and to the development of alternative and more advantageous nematode control strategies not harmful to the environment as alternative to the existing control methods.

Keywords Potato-cyst-nematodes, saponins, hatching tests, root exudates, mortality tests, fractionation, *Solanum sisymbriifolium*.

I. INTRODUÇÃO

Os Nematoda representam o maior filo do reino animal (80-90%) em termos de número de indivíduos (Bongers, 1988; Blaxter *et al.*, 1998), com uma estimativa de 100.000 a 1 milhão de espécies (Lambshhead, 1993). São encontrados em todo o mundo em qualquer lugar onde exista matéria orgânica. Devido às suas associações tróficas (alimentação algal, bacteriana, fungal e vegetal; entomofílica, predatória e omnívora) (Yeates *et al.*, 1993), eles afetam os fluxos de carbono e de nutrientes em todos os principais ecossistemas (Bardgett *et al.*, 1999). Os seus habitats incluem os mares, a água doce, o solo e quase todas as espécies de plantas e animais. (Ravichandra, 2014).

Das cerca de 26.600 espécies descritas, 16.000 são parasitas – e destes, 4105 parasitam plantas (Hugot *et al.*, 2001). Os nemátodes fitoparasitas são microscópicos e caracterizados pela presença de um estilete, que é usado para a entrada nos tecidos da planta hospedeira. Apesar de algumas espécies se alimentarem das partes superiores da planta, como as folhas, caules, flores e sementes, a maioria alimenta-se das raízes, bolbos e tubérculos. Algumas espécies têm um hospedeiro bastante específico, por exemplo *Heterodera glycines*, que infecta principalmente a soja; mas outros não, como *Meloidogyne incognita*, que tem mais de 1000 hospedeiros. (Ravichandra, 2014). Na Europa, os géneros que causam mais danos nas plantas são *Heterodera*, *Globodera*, *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Pratylenchus*, *Aphelenchoides*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, *Longidorus* e *Tylenchulus* (Sasser, 1987).

Os nemátodes de quisto da batateira (NQB), *Globodera pallida* e *G. rostochiensis* são endoparasitas originários da região dos Andes (Peru e Bolívia), na América do Sul. Pensa-se terem sido introduzidos na Europa por volta de 1850 juntamente com batatas provenientes dos Andes, durante a Grande Fome na Irlanda. Foram importadas para a prática de melhoramento genético das batatas europeias, para aumentar a resistência à “praga da batata” (*Phytophthora infestans*) (Evans & Stone, 1977). Desde essa época, os NQB espalharam-se para praticamente todos os lugares em que há a cultura de batatas, sendo que uma ou ambas as espécies já foram notificadas em 47 países. Os nemátodes passaram despercebidos até 1881, quando Kühn registou a sua descoberta nas batatas e os referiu como *Heterodera schachtii*. Em 1923, Wollenweber diagnosticou o “quisto da batateira” como uma espécie separada, *Heterodera rostochiensis*, e em 1972, uma nova espécie de nemátode (*H. pallida*) foi descrita por Stone (considerada até aqui como um patótipo de *H. rostochiensis*). A maioria da literatura, registos e dados referentes a *H.*

rostochiensis que datem de antes de 1972 podiam referir-se igualmente a *H. pallida*, pelo que nem sempre é possível determinar qual espécie foi referida nas publicações anteriores. Para juntar os NQB e espécies afins com quistos redondos, Skarbilovich (1959) criou o subgénero *Globodera* que mais tarde foi elevado ao status de género por Behrens (1975) (Evans & Brodie, 1980; DSQP, 2008).

São assim chamados, devido à estrutura que lhes confere sobrevivência no solo: o quisto. Esta estrutura protetora que envolve os ovos, causa um especial problema no seu controlo (Lamberti & Taylor, 1986). Estes nemátodes são caracterizados por um acentuado dimorfismo sexual. As fêmeas são esféricas, visíveis a olho nu (com diâmetro de ~ 450 µm) e sedentárias, permanecendo na raiz. Após a fecundação, produzem centenas de ovos (200-500) e entram num processo de maturação. Depois do amadurecimento morrem, a sua cutícula endurece e forma o quisto (Evans & Stone, 1977; Timmermans, 2005). Eventualmente o quisto cai da raiz e fica no solo (CABI/EPPO, nd). Os ovos, que estão armazenados dentro do quisto, podem sobreviver no solo durante muitos anos (mais de 20) sem a presença de uma planta hospedeira (Jones *et al.*, 1998). Se forem estimulados por exsudato de batateira (ou de outra planta hospedeira), 60% a 80% dos ovos eclodem em poucos dias e continuam o ciclo de vida (Fenwick & Reid, 1953; Ellenby & Gilbert, 1958), valor que pode aumentar em solos arenosos (Jones, 1970). Os J2, ou jovens do segundo estágio, são vermiformes, com ~ 445 a 510 µm de comprimento e são móveis. Depois de saírem dos ovos, os J2 invadem as raízes (Jones, 1981) e criam um local de alimentação (o sincício), onde continuam o seu desenvolvimento (muda para J3, e depois para J4) (CABI, 2013). O desenvolvimento, desde a eclosão até à forma adulta, dura de 38 a 45 dias. Os J2 diferenciam-se de acordo com os fatores ambientais e nutrientes disponíveis; quando as condições ambientais são desfavoráveis os machos são relativamente mais abundantes, pois precisam de menos alimento do que as fêmeas e não se alimentam durante a fase de vida livre (Evans, 1970). Geralmente, os J2 que penetram nas células do periciclo são mais suscetíveis de se tornarem machos, ao passo que aqueles que penetram as células procambiais tendem a tornar-se fêmeas (Golinowski *et al.*, 1997). As fêmeas adultas crescem e irrompem pela raiz com a extremidade da cauda, facilitando o acasalamento (Baldwin & Mundo-Ocampo, 1991). A parte anterior do corpo fica incorporada na parte interior da raiz, onde se alimenta do sincício. As fêmeas libertam uma feromona sexual para atrair os machos, que estão presentes no solo. Os machos são vermiformes, com cerca

de 1-1,2 mm de comprimento, são móveis e têm um tempo de vida curto (de aproximadamente 10 dias). Gastam todo o seu tempo de vida no acasalamento (com até 10 fêmeas) (CSL, 2003).

As duas espécies, *G. rostochiensis* e *G. pallida*, podem ser distinguidas pela cor das fêmeas imaturas, amarelo-dourado em *G. rostochiensis* e creme-branco em *G. pallida*. Para além disso, os quistos de *G. rostochiensis* diferem dos de *G. pallida* por terem uma distância média anal-vulvar maior, 60 µm em comparação com 44 µm. O comprimento do corpo da larva, do estilete e da cauda é ligeiramente maior em *G. pallida*, e possuem um menor número médio de estrias cuticulares entre o ânus e a vulva, 12,2 µm em comparação com 24,6 em *G. rostochiensis* (Hooker, 1981). O seu principal hospedeiro é a batateira (*Solanum tuberosum*), embora já sejam conhecidas 90 espécies do género *Solanum* também seus hospedeiros, incluindo o tomate e a beringela (Ravichandra, 2014). A nível de adaptações climáticas, *G. pallida* eclode a cerca de 10°C ou menos e está adaptado para se desenvolver em temperaturas baixas, entre 10 e 18 °C, enquanto *G. rostochiensis* parece estar adaptado a uma gama de temperatura de 15 a 25°C (Franco, 1979). A humidade do solo tem um efeito importante no movimento dos J2, pelo que toleram a seca e o gelo mas preferem climas húmidos, quentes a temperados. A duração do dia também influencia a eclosão dos ovos, que é mais rápida se o anfitrião tiver luz contínua, em vez de horas prolongadas de escuridão (Hominick, 1986). Eles são uma grave restrição à produção agrícola, e os seus efeitos são agravados quando combinados com outros stresses abióticos como a seca, o calor, a má gestão das culturas e uma baixa disponibilidade de nutrientes (Saxena *et al.*, 1988).

A invasão dos NQB tem uma forte influência na batateira, começando pela diminuição da eficácia de absorção dos nutrientes pelas plantas, que vai limitar o desenvolvimento foliar (Trudgill *et al.*, 1975). Isto vai resultar na redução da intercepção total da luz pelas plantas, e uma consequente redução da atividade fotossintética. Deste modo, há uma limitação da síntese de hidratos de carbono, sendo uma restrição direta para uma cultura de batateiras. Os danos causados também afetam negativamente a capacidade das batateiras ao acesso e transporte de água, o que provoca a senescência prematura da planta (Hay & Porter, 2006). Muitos dos sintomas são observáveis acima do solo – baixa estatura da planta, murchidão, clorose das folhas; e podem ser atribuídos à falta de água/nutrientes (Stirling *et al.*, 1998). Como os sintomas são pouco característicos faz com

que o problema seja subestimado pelos agricultores (De Waele & Elsen, 2007). Para além disso, a dificuldade na sua deteção aumenta devido à sua ação subterrânea, e por serem de natureza microscópica. Brown (1969) relatou que se perde, em média, uma tonelada do tubérculo por acre a cada aumento de 20 ovos/g de solo. Em solos frios, o declínio anual na produção da batata causados numa cultura pelos NQB é cerca de 18% (Grainger, 1964), mas em solos quentes (temperaturas acima 30°C) a diminuição pode ir até 95% (Schluter, 1976).

Na União Europeia, o custo estimado das perdas anuais causadas pelos NQB é de 300 a 400 milhões de euros (Ryan *et al.*, 2000; Moxnes & Hausken, 2007). Para além de estarem um pouco por toda a Europa, também estão presentes em África, na América (do Norte, Central e do Sul), na Ásia e na Oceânia (Evans & Stone, 1977, CABI/EPPO, nd). De acordo com uma estimativa, a perda da colheita anual global causadas por nemátodes fitoparasitas vai da ordem dos 69 aos 111 milhares de milhões de euros (Sasser & Freckman, 1987; Batish *et al.*, 2008). Em Portugal, os nemátodes fitoparasitas também são um problema. *G. rostochiensis* foi assinalado pela primeira vez em Portugal em 1956, num campo de batata-semente próximo de Bragança (Macara, 1963). *Globodera pallida* foi identificada pela primeira vez no nosso país em 1988 (Santos & Fernandes, 1988). Para além da presença de *Globodera* spp., já foi detectada a sua coexistência com outros nemátodes, *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp. (Esteves *et al.*, 2015).

Existem várias medidas para controlar os NQB, e cada uma delas tem as suas vantagens e desvantagens. A rotação de culturas com plantas não-hospedeiras é o método de luta mais utilizado, tendo várias vantagens – melhora as características físicas, químicas e biológicas do solo; auxilia no controlo de infestantes, doenças e pragas; repõe a matéria orgânica e protege o solo da ação dos agentes climáticos (Bullock, 1992). Com a sua prática, os níveis populacionais de nemátodes são reduzidos, uma vez que a cada ano uma certa proporção dos ovos dentro dos quistos morre ou eclode. Isso impede os NQB de atingir densidades populacionais altas o suficiente para reduzir substancialmente o rendimento da produção. Climas mais quentes permitem maiores taxas de decréscimo anual, reduzindo o intervalo de rotação (Winslow *et al.*, 1972). No entanto, esta medida também é desvantajosa, sendo a batata uma cultura economicamente rentável, tal rotação é muitas vezes indesejada pelos agricultores, pois requer períodos de 6 a 7 anos sem cultivar no terreno plantas da família das Solanáceas (Timmermans, 2005). Para além disso, este

método resulta na diminuição da população do nemátode, não na sua total erradicação. Como tal outras medidas de controlo devem ser tomadas.

A solarização do solo é outro método, realizado através da cobertura do solo húmido com um filme transparente de polietileno, durante 6-8 semanas durante as estações mais quentes do ano, antes do plantio (Katan, 1981). Essa cobertura provoca um efeito estufa que eleva a temperatura do solo causando a morte ou o enfraquecimento dos nemátodes, com reduções de 42% a 100% na população. Este método tem sido usado para o controlo de *G. rostochiensis* em condições de campo de Nova Iorque (LaMondia & Brodie, 1984), onde as populações foram reduzidas em 96-99% a 10 cm de profundidade do solo. Para além de ser eficaz, não é tóxico e pode ser facilmente utilizado em pequena ou grande escala. No entanto, existem algumas desvantagens: é um método restrito a áreas com verões quentes/mornos; a produção é interrompida durante o verão, o que pode não encaixar com alguns ciclos de cultivo e ser difícil para aqueles que utilizam uma pequena quantidade de terra intensivamente; há um número limitado de pontos de venda de plásticos com inibição de UV; são utilizadas grandes quantidades de plástico que podem não ser recicladas; ventos fortes e animais podem rasgar o plástico. Pode ainda matar fauna e flora benéfica que exista no local. Além do mais, os nemátodes existentes nos níveis mais profundos do solo podem sobreviver à solarização e danificar plantas com sistemas radiculares profundos (Elmore *et al.*, 1997). A utilização da solarização juntamente com a biofumigação tem sido avaliada como alternativa para o controlo de organismos fitopatogénicos do solo com bons resultados (Gamliel & Stapleton, 1993a,b; Blok *et al.*, 2000).

A biofumigação é um método que também tem sido utilizado e consiste na incorporação de matéria orgânica no solo, principalmente resíduos de brássicas e resíduos ricos em nitrogénio (como estrume de galinha ou vaca, resíduos de colheita, lixos orgânicos), que reduzem a viabilidade dos organismos fitopatogénicos no solo. O efeito supressor é atribuído a uma gama de produtos biologicamente ativos, incluindo os isotiocianatos (ITC), tóxicos e altamente voláteis, bem como cianetos orgânicos menos tóxicos, oxazolidinonas, nitrilos e tiocianato iónico libertados mediante hidrólise enzimática pela mirosinase (Bones & Rossiter, 2006). É particularmente interessante pelo seu baixo custo e efeito agronómico positivo no crescimento das plantas e nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Davey, 1996). Para além disso, permite a gestão dos

resíduos gerados nas aglomerações urbanas e nos processos agro-industriais, e pode aumentar a resistência das plantas ao estimular o desenvolvimento das raízes (De Bertoldi, 2008). Na Nigéria, foi relatado um caso bem sucedido de controlo de nemátodes utilizando estrume de galinha e de vaca e serragem (Babalola, 1982; Chindo *et al.*, 1991). No estudo conduzido por Ngala *et al.* (2014), a incidência de *G. pallida* foi reduzida em aproximadamente 50% nas culturas semeadas no verão por biofumigação com resíduos de brássicas (Sarwar & Kirkegaard, 1998; Ngala *et al.*, 2014). Outro estudo demonstrou que houve redução do número de quistos, ovos e juvenis de *G. rostochiensis* (Ro1) e *G. pallida* (Pa2 e Pa3) com a incorporação de combinações de estrume de cavalo/porco/aves/bovino e bagaço de beterraba/uva no solo infectado com os nemátodes (Renčo *et al.*, 2011).

O uso de cultivares resistentes aos nemátodes também está entre as estratégias de controlo. No entanto, quando são plantados cultivares resistentes com muita frequência, os NQB têm a capacidade de desenvolver resistência. A introdução de cultivares de batata (parcialmente) resistentes de *Solanum vernei* e *S. tuberosum* subsp. *andigena* iniciou um processo de seleção para patótipos dentro da população de nemátodes que foram capazes de se reproduzir nas cultivares resistentes. No final dos anos '60 e início dos anos '70, as resistências de *S. tuberosum* subsp. *andigena* e *S. vernei* tinham sido quebradas (Mulder, 1994). Um razoável grau de tolerância revelou ser necessário e a visão atual é que cultivares resistentes também precisam de mostrar tolerância. A utilização de cultivares (parcialmente) resistentes levou a um aumento da virulência nas populações de NQB (Turner & Fleming, 2002). Por isso, o mais eficaz são as seleções estabilizadas pela alternância de cultivares resistentes e suscetíveis, em conjunto com a rotação de culturas (Jones, 1969). A utilização de cultivares resistentes é frequentemente limitada pela sua disponibilidade. Alguns estão presentes no mercado, por exemplo, a batata para consumo cv. 'Santé', que tem mostrado reduzir a multiplicação de algumas populações de *G. pallida* (Whitehead, 1991), mas ainda existe uma falta comercial destas cultivares resistentes (Urwin *et al.*, 2001).

Muitos produtores utilizam também nematodocidas sintéticos (fumigantes, granulares ou líquidos) (Lainsbury, 2014). Dentro destes, existem os carbamatos – como o aldicarbe, o carbofurano e o oxamil (associados à mortes de aves), que já não são permitidos; e os organofosforados - étoprofos, fenamifos, cadusafos, fostiazato, terbufos, fensulfotião, forato (Chitwood, 2003). O seu uso já foi proibido pela União Europeia (UE)

devido à sua toxicidade para o meio ambiente e ação carcinogénica nos humanos. Existem nematodocidas com base biológica, que são menos tóxicos: DiTera[®], registado em 1996, obtido a partir de compostos produzidos pelo fungo (parasita de nemátodes) *Myrothecium verrucaria* (Paranjape *et al.*, 2014); ClandoSan[®]618 (1998), produzido a partir de exoesqueletos processados de caranguejo e lagosta, contendo grandes quantidades de quitina e ureia (Beaulieu, nd); e Sincocin (1997) ou "Extrato vegetal 620", constituído por uma mistura de extratos de *Opuntia lindheimeri*, *Quercus falcata*, *Rhus aromatica*, e *Rhizophora mangle* (Bird, 2014). Este método de controlo reduz as densidades populacionais de nemátodes fitoparasitas em 80%, permitindo rotações curtas (uma cultura da batata a cada três anos). No entanto, os efeitos obtidos na prática muitas vezes não são tão altos e as percentagens de redução alcançadas são insuficientes para evitar que a população aumente. Além disso, também a relação custo / benefício é baixa (Schomaker & Been, 1999). A repetida utilização do mesmo pesticida nas culturas leva ao aumento dos mecanismos de biodegradação do solo (Karpouzias *et al.*, 2004; Qui *et al.*, 2004; Arbeli & Fuentes, 2007) e ao desenvolvimento de resistência por parte dos nemátodes (Meher *et al.*, 2009). Os nematodocidas não eliminam a longo prazo os nemátodes, e as preocupações ambientais e de saúde têm resultado num aumento de restrições à sua utilização.

Alguns procedimentos mais seguros para controlo de nemátodes têm sido desenvolvidos com base em agentes de controlo biológico (Pérez *et al.*, 2003). Os nemátodes, assim como os outros organismos, têm inimigos naturais que reduzem a sua capacidade de sobreviver e se reproduzir. Os fungos antagonistas são dos mais importantes potenciais agentes de controlo biológico dos nemátodes fitoparasitas (Taylor & Sasser, 1978). Alguns exemplos já estudados incluem o fungo armadilha *Monacrosporium lysipagum*, que captura nemátodes na fase móvel através de estruturas adesivas (Khan *et al.*, 2004, 2006). Estas estruturas ligam-se aos nemátodes de forma irreversível provocando a sua morte (Saxena & Mittal, 1995), podendo também produzir toxina(s) que imobilizam os nemátodes antes da penetração das hifas na cutícula (Olthof & Estey, 1963). Outros antagonistas importantes são *Paecilomyces lilacinus*, parasita de ovos de *Meloidogyne* spp. e de quistos de *Heterodera* spp. e *Globodera* spp. (Jatala *et al.*, 1979); e o fungo *Pochonia chlamydosporia*, que reduz a multiplicação de *Globodera* spp. em plantações de batata (Tobin *et al.*, 2008). Também podem ser usadas bactérias para realizar este tipo de controlo. *Pasteuria nishizawae*, uma bactéria micelial formadora de esporos, parasita as

fêmeas adultas de nemátodes do género *Heterodera* e *Globodera* (Sayre *et al.*, 1991). *Pseudomonas fluorescens* produz DAPG (2,4-diacetilfloroglucinol), que se sabe ser um composto responsável pelo aumento da eclosão dos J2 e pela redução da sua mobilidade (Cronin *et al.*, 1997). *Trichoderma harzianum* permite o biocontrolo de *M. javanica* no tomate através de *P. fluorescens* (Siddiqui & Shaukat, 2004).

Para além destes organismos, também algumas plantas têm demonstrado um papel importante no controlo biológico dos nemátodes fitoparasitas. Um método de controlo bastante eficaz é utilizar as plantas como cultura-armadilha. Shelton e Badenes-Perez (2006) descreveram as culturas-armadilha como sendo plantas implantadas numa cultura, para atrair, desviar ou interceptar agentes patogénicos, a fim de reduzir os danos que estes causam na cultura principal. Alguns exemplos deste tipo de medida são o agrião-da-terra (*Barbarea vulgaris*), utilizado como planta-armadilha para reduzir infestações da traça *Plutella xylostella* em campos de couve (Badenes-Perez *et al.*, 2005); e a ervilha (*Pisum sativum*) na Austrália (Grundy *et al.*, 2004), e o sorgo (*Sorghum bicolor*) nos EUA (Tillman & Mullinix, 2004), utilizadas para reduzir as populações em campos de algodão da mariposa *Helicoverpa* spp. As brassicáceas podem atuar como culturas-armadilha para nemátodes (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003). O caso mais bem documentado da sua utilização para este fim é o do controlo de nemátodes-de-quisto da beterraba (*Heterodera schachtii*) na Europa (Muller, 1999; Schlathoelter, 2004; Matthiessen & Kirkegaard, 2006). O rabanete (*Raphanus sativus*) e a mostarda branca (*Sinapis alba*) (brassicáceas), ao serem cultivadas antes das plantações de beterraba, ajudam a reduzir as populações dos nemátodes existentes no solo. Elas são invadidas pelos nemátodes, mas a sua diferenciação sexual é interrompida, o que resulta em números muito baixos de fêmeas na geração seguinte, causando o declínio significativo da população (Caubel & Chaubet, 1985; Lelivelt & Hoogendoorn, 1993). Há compostos que provocam outro tipo de efeitos nos patógenos, por exemplo, algumas espécies de *Crotalaria* têm uma ação anti-nemátode através de três mecanismos: por compostos que afetam o desenvolvimento larvar; pela exsudação de compostos nematotóxicos (alcalóides, tais como a monocrotalina), que também estão presentes nas folhas e sementes; e pela estimulação da microflora antagonista durante a decomposição da planta (ou biofumigação) (Ratnadass *et al.*, 2012).

Relativamente aos NQB, existe a planta *S. sisymbriifolium* (Lamarck), que foi introduzida recentemente na Holanda como cultura-armadilha (Timmermans *et al.*, 2005).

Scholte (2000a) demonstrou que a própria batata poderia ser utilizada para provocar a eclosão dos nemátodes, mas não é o ideal pois traria complicações relativamente ao tempo exato de destruição das culturas, e pela estimulação de outras doenças da batata. Variedades de *S. nigrum* também mostraram uma forte estimulação da eclosão dos J2, e também foram completamente resistentes a *G. rostochiensis*. Em *G. pallida*, observou-se que houve alguns J2 que conseguiram desenvolver-se. Após uma extensa investigação de potenciais solanáceas, *S. sisymbriifolium* foi então selecionada como uma candidata promissora (Scholte, 2000b). Esta espécie atingiu um nível de estimulação um pouco menor do que a da batateira suscetível, causando 77% de eclosão numa população de NQB com 2 anos, comparando com os 87% causados pela batateira (Scholte e Vos, 2000).

Solanum sisymbriifolium é uma planta anual da família das Solanáceas, originária da América do Sul (Argentina, Brasil, Peru e Uruguai), também chamada de jua-de-toca ou tomate-lichi, sticky nightshade (em inglês) ou moreille de balbis (em francês). É uma planta arbustiva muito ramificada, coberta com espinhos por toda a planta (menos nos frutos), podendo atingir até 1,5 m de altura. As pétalas das flores são azuis/brancas, com anteras amarelas; e os frutos são bagas encarnadas (quando maduras), com 1 a 3 cm de diâmetro e envoltos por cálices espinhosos (Hill & Hulley, 2000). É bem sucedida em qualquer tipo de solo e pH, requer humidade e prospera em turfa e solos arenosos, e é tolerante a situações de baixa luminosidade (PCN Control Group, 2004). Quando plantada no campo, *S. sisymbriifolium* germina em 2 a 4 semanas, crescendo mais lentamente nas primeiras 6 semanas, mas depois desse período tem um crescimento vigoroso (PCN Control Group, 2004). A planta tem várias utilizações na medicina tradicional, pois tem ação diurética, analgésica, contraceptiva, antisifilitica e hepatoprotetora (Argentina), antipirética (Peru) e é usada para o tratamento de diarreia, de infeções respiratórias e urinárias (Ferro *et al.*, 2005; Apu *et al.*, 2013). Os seus frutos são fonte de solasodina, usadas na síntese de corticosteróides e hormonas sexuais (componentes dos contraceptivos orais). São comestíveis e consumidos regularmente por aves indígenas (Hill & Hulley, 1995) e descascados, são usados como vegetais (Bhuyan & Hossan, 2012). Os estudos farmacológicos da planta revelaram atividade moluscicida (Silva *et al.*, 2005), atividade hipotensiva da raiz (Ibarrola *et al.*, 2000, 2001), alta citotoxicidade das flores (Mamone *et al.*, 2011), e os frutos secos mostraram atividade antidepressiva do sistema nervoso central e anticonvulsivante (Chauhan *et al.*, 2010).

Em relação ao perfil fitoquímico de *S. sisymbriifolium*, sabe-se que a planta possui baixos teores de alcalóides e esteróides, moderadas concentrações de flavonóides e elevado teor em taninos (Shilpi *et al.*, 2005). Diversos alcalóides foram isolados das raízes, como a cuscohigrina (Evans & Somanabandhu, 1980), solacaproína (Ferro *et al.*, 2005), solamina, solasodiena e solasodina (Mazumdar, 1984). Foi também isolada uma saponina esteróide, isonuagenina-3-*O*- β -solatriose (Ferro *et al.*, 2005). Nos frutos foram encontradas lignanas (à qual foi dado o nome de sisymbriifolina) e um esterol C30 (campesterol) (Chakravarty *et al.*, 1996). Nos frutos secos foi isolada solasodina, um glicoalcalóide venenoso (Chauhan *et al.*, 2010). A parte aérea contém derivados do espirostano (Chakravarty *et al.*, 1996). Num estudo mais recente (Gupta *et al.*, 2014), foram avaliados quantitativamente os diferentes fitoquímicos da parte aérea e os resultados foram: 67,7 mg/g (de extrato seco) de alcalóides, 30 mg/g de flavonóides, 23,8 mg/g de taninos, 7,1 mg/g de compostos fenólicos e 2,5 mg/g de saponinas. Foi questionado se estariam presentes nesta planta os glicoalcalóides da batata – solanina e chaconina, possivelmente fatores de eclosão naturais (Devine *et al.*, 1996; Byrne *et al.*, 1998), mas na análise do exsudato de *S. sisymbriifolium* nem solanina nem chaconina foram detetadas (Sasaki-Crawley, 2013).

Esta planta tem sido utilizada na Europa como método de controlo alternativo dos NQB. É utilizada como cultura-armadilha da seguinte forma: é semeada num campo agrícola infestado, onde vai estimular a eclosão dos nemátodes presentes no solo. Porém, como estas plantas são completamente resistentes a estes nemátodes, depois de penetrarem na raiz eles não conseguem continuar o desenvolvimento para além do estado J3. O facto de existirem alguns J3 sugere que a formação do sincício é induzido, havendo uma posterior incompatibilidade entre a planta e os nemátodes (Roberts & Stone, 1983; Sasaki-Crawley, 2013). Sem se poderem alimentar, o seu período de sobrevivência no solo é inferior a duas semanas (Robinson *et al.*, 1987), acabando por não haver formação de novos quistos. Com este processo obtém-se uma redução de 50 a 80% das populações de NQB (Scholte, 2000a,b; Scholte & Vos, 2000; Timmermans *et al.*, 2005). A espécie é também altamente resistente aos nemátodes *Meloidogyne*, *Trichodorus* e *Pratylenchus* (PCN Control Group, 2004; Timmermans, 2005), aos fungos *P. infestans* e *Verticillium dahliae* (Alconero *et al.*, 1988), e as suas raízes são resistentes à bactéria *Pseudomonas solanacearum* (Ali *et al.*, 1990). No entanto, um estudo recente (Dias *et al.*, 2012) reportou que *S. sisymbriifolium* era susceptível a *M. hapla*, embora fosse resistente a *M. chitwoodi*.

De um ponto de vista agronómico as suas características são favoráveis: tem alta tolerância tanto a climas quentes como às geadas noturnas, e cresce bem em solos acídicos (Scholte, 2000a,c). A sua inclusão nos sistemas de cultivo não apresenta grandes problemas (Scholte e Vos, 2000), porque a espécie não age como planta hospedeira para importantes pragas e doenças. No entanto, é necessária uma cuidadosa avaliação antes da sua implementação, pois esta planta tende a ser invasora. O risco do desenvolvimento da “praga da batata” (*P. infestans*) embora muito pequena, deve ser gerida através de um tempo correto de destruição de culturas (Timmermans, 2005). Para além disso, enquanto a cultura-armadilha é cultivada, o terreno deixa de estar disponível para outras culturas. O ideal seria aproveitar o potencial nematocida desta planta, e converter os seus compostos em fórmulas comerciais, como já é feito para outras plantas (Chitwood, 2002).

O nosso planeta abriga aproximadamente 600.000 espécies vegetais, mas menos de 10% foram estudadas cientificamente no aspeto químico e farmacológico (Korolkovas, 1988). A grande variedade de substâncias presentes na flora continua a ser um enorme atrativo na área de controlo de patógenos, principalmente se se tiver em consideração que uma pequena quantidade de plantas foi investigada com tal finalidade (Vieira & Fernandes, 1999). Um grande número de espécies de plantas com metabólitos secundários com atividade nematocida tem sido descoberto ano após ano (Chitwood, 2002; D’Addabbo *et al.*, 2009, 2011; Ntalli & Caboni, 2012; Avato *et al.*, 2013). A sua utilização, como forma de controlo alternativo, pode ser feita quer através de extratos de plantas e formulações fitoquímicas sintéticas mais eficazes e mais ecológicas, quer diretamente na agricultura como adubos orgânicos (Akhtar & Malik, 2000; Hynes & Boyetchko, 2006; Ntalli & Caboni, 2012). Muitos fitoquímicos são mais seguros para o ambiente ou para os seres humanos do que os tradicionais nematocidas químicos, e os custos de registo de um fitoquímico são menos elevados do que um pesticida convencional (pela U.S. Environmental Protection Agency) (Chitwood, 2002). Os fitoquímicos podem ser produzidos em diferentes partes da planta, como nas folhas, frutos ou raízes; e agem em geral como sistema de defesa contra agentes externos. Podem ser responsáveis também pela cor, sabor e aroma (p. ex. cianidina, polifenol responsável pela cor roxa do mirtilo; capsaicina e piperina, alcalóides que criam a sensação picante de certos pimentos; alicina, que origina o cheiro pungente do alho) (Brodnitz *et al.*, 1971; Lawless *et al.*, 1985; Stintzing *et al.*, 2002; Johnson & Williamson, 2003; Szallasi, 2005).

A família Solanaceae contém fitoquímicos com significativa toxicidade, que são utilizados no controlo de pestes; como por exemplo *Nicandra physaloides* contra moscas (Smith & Downs, 1966), *Nicotiana tabacum* contra vários insetos; *Datura stramonium* no controlo da cigarrinha verde *Empoasca kraemeri* e *S. lycopersicum* no controlo do mariposa branca (Gomero, nd).

Em relação ao controlo de nemátodes, existe um largo espetro de plantas com propriedades nematodocidas: *Lonchocarpus* spp., *Derris* spp., *Tithonia diversifolia*, *Chromolaena odorata*, *Peganum harmala* (através de alcalóides) (El Allagui *et al.*, 2007; Thoden *et al.*, 2007, 2009; Odeyemi & Adewale, 2011; Ntalli & Caboni, 2012); a família Brassicaceae (pelos glucosinatos) (Buskov *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011); *Azadirachta indica* (através de limonóides) (Akhtar, 2000; Oka *et al.*, 2007); *Cymbopogon* spp., *Origanum* spp., *Carum carvi*, *Foeniculum vulgare*, *Coridothymus capitatus*, *Mentha* spp., *Eucalyptus* spp., *Pelargonium graveolens*, *Melissa officinalis*, *Ocimum* spp., *Chamaespartium tridentatum*, *Satureja montana*, *Thymbra capitata* e *Thymus caespititius*, *Coriandrum sativum*, *Liquidambar orientalis* e *Valeriana wallichii* (através de óleos essenciais) (Sangwan *et al.*, 1990; Leela *et al.*, 1992; Oka *et al.*, 2000; Batish *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Ntalli *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2010); *Tagetes* spp. e outras Asteráceas (através de polifenilos) (Chitwood, 2002); *Castanea sativa* (através de taninos) (Maistrello *et al.*, 2010; Renco *et al.*, 2012); *Acacia gummifera* e *Tagetes patula* (pelos flavonóides) (Ntalli & Caboni, 2012) e *Sorghum sudanense*, *Manihot esculenta* (através de glicosídeos cianogénicos) (Widmer & Abawi, 2000; Chitwood, 2002). Quanto aos NQB, têm sido relatadas plantas com compostos que permitem o seu controlo agindo como nematodocidas e inibidores da eclosão, como *Medicago sativa* (saponinas) e *Artemisia annua* (D'Addabbo *et al.*, 2011, 2013). A identificação dos fitoquímicos específicos destas interações é muito útil para a realização de fórmulas comerciais para o controlo de nemátodes, como a “FloraNeem” (à base de *Azadirachta indica*) (Javed *et al.*, 2007; El-Din, *et al.*, 2012), ou outras com base em extratos de quilaia (*Quillaja saponaria*) e de cravo-da-índia (*Tagetes erecta* L.) (Renčo *et al.*, 2012).

Os compostos envolvidos nas interações planta-nemátode têm-se tornado cada vez mais o foco destas estratégias alternativas, aumentando o interesse dos investigadores em relação ao estudo dos efeitos de extratos e exsudatos de plantas. Estes podem ter diferentes modos de ação para controlar as populações, podendo ser estimulantes, repelentes,

nematodocidas, estimuladores ou inibidores da eclosão (Costa *et al.*, 2003). Relativamente aos agentes eclosivos, investigações revelaram que estava implicado um grupo de pelo menos nove compostos químicos no processo da eclosão (Devine & Jones, 2000). A solanoeclepina A foi um dos compostos purificados (Mulder *et al.*, 1996), naturalmente presente nos exsudatos de *S. tuberosum*. Quando foi questionado se este composto existia em *S. sisymbriifolium*, os resultados revelaram que não existia, e que a planta exalava um fator de eclosão diferente (Sasaki-Crawley, 2013). Por outro lado, já foram identificados inibidores de eclosão em exsudatos de espécies não-hospedeiras, como na mostarda branca (Forrest & Farrer, 1983), no espargo (Takasugi *et al.*, 1975), em espécies de *Bupleuruni salicifoliurn* (Gonzalez *et al.*, 1994) e de *Derris* (Birch *et al.*, 1993). Surpreendentemente, nos exsudatos da batateira também estão presentes inibidores de eclosão de NQB (Byrne *et al.*, 1998), o que demonstra a complexidade das interações que ocorrem a este nível.

Este trabalho teve vários objetivos.

- Em primeiro lugar avaliar o efeito de *S. sisymbriifolium* na eclosão dos J2 de um isolado de *G. pallida* e outro de *G. rostochiensis*.
- Estudar as diferenças entre três extratos (parte aérea, raiz e solo) e entre três idades diferentes da planta (1, 2 e 3 meses), de modo a aquilatar qual a combinação de fatores que pode originar maior percentagem de eclosão.
- Fracionar por cromatografia em coluna o extrato que se mostrar mais promissor, e testar o efeito na eclosão de todas as frações obtidas, a fim de inferir qual a que mais contribui para essa atividade.
- Testar o efeito nematodocida dos extratos de *S. sisymbriifolium* e das frações.
- Estabelecer um perfil fitoquímico de *S. sisymbriifolium*, por cromatografia em camada fina, para cada um dos três extratos analisados (parte aérea, raiz e solo).

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção de exsudato de *Solanum tuberosum* (cultivar Desirée)

Os exsudatos foram obtidos através da lixiviação sucessiva do solo envasado (Shepherd, 1986), com batateiras (*Solanum tuberosum*) cv. Desirée com cerca de um mês de idade. Após regar com água da torneira para humedecer o solo, foi adicionado ao solo cerca de 0,5 L de água da torneira. O lixiviado recolhido foi filtrado através de um papel de filtro Whatman nº1, de modo a eliminar pequenas partículas de solo arrastadas durante o processo de recolha do lixiviado. Por fim foi colocado no frigorífico a 4°C num frasco escuro, até ser utilizado (validade de 1 mês).

2. Obtenção de quistos de *Globodera* spp.

Os quistos das duas espécies de nemátodes-de-quisto da batateira (NQB), *Globodera pallida* e *G. rostochiensis*, já existentes no laboratório, foram recolhidos em campos da zona centro de Portugal.

Para multiplicar as populações procedeu-se do seguinte modo: os quistos foram colocados dentro de um suporte com uma rede (20 nm de malha) dentro de um copo com água da torneira, e mantidos durante cerca de 8 dias na estufa, no escuro, a 22°C. Em seguida, a água foi substituída por exsudato de batateira. Os jovens do segundo estágio (J2) foram sendo recolhidos e contados. As batateiras, com cerca de 7/8 dias após terem sido semeadas em solo esterilizado, foram inoculadas com 1800 J2/cada, regadas diariamente com água e fertilizadas uma vez por semana com uma solução nutriente (Hyponex).

Dez semanas após a inoculação as plantas foram cortadas e o solo foi seco e levigado utilizando o levigador de Fenwick (Fenwick *et al.*, 1940). Os quistos foram recolhidos posteriormente ao microscópio estereoscópico, com o auxílio de uma pinça de bicos finos.

3. Obtenção das plantas e preparação dos extratos de *Solanum sisymbriifolium*

As plantas de *Solanum sisymbriifolium* foram obtidas a partir de sementes cedidas pela empresa Vandijke Semo, Scheemda, Holanda. Em testes preliminares foi observado

que a cv. Sis 6001 tinha maior efeito na eclosão (Dias, comunicação pessoal), sendo por isso a escolhida para utilizar neste trabalho.

As sementes foram colocadas a germinar em papel de filtro humedecido em caixas de Petri, numa estufa, no escuro, com temperatura de 22°C. Quando começavam a germinar foram transferidas para vasos com uma mistura de solo/areia esterilizados. Quando apresentavam dois pares de folhas verdadeiras foram transferidas para vasos maiores para o seu crescimento não ser afectado.

As plantas com 1, 2 e 3 meses foram desenraizadas e o sistema radicular foi lavado e separado da parte aérea (caules e folhas). Todas as partes foram mantidas numa estufa aquecida a 30°C, com circulação de ar, para secagem. Depois de secas, a parte aérea e a raiz foram separadamente pulverizadas e tratadas com água, numa proporção de 1:10 (m/v), em banho-maria a 100°C, durante 60 min. Os extratos obtidos (decoctos) foram filtrados sob vácuo, concentrados num evaporador rotativo e liofilizados. O solo onde as plantas cresceram foi macerado em água durante 24h, no escuro, depois filtrado no vácuo, concentrado no evaporador rotativo e liofilizado. Foram assim obtidos três extratos diferentes: parte aérea (PA), raiz (R) e solo (S).

Para a sua utilização nos testes de eclosão e de mortalidade foram pesados 16 mg de cada extrato liofilizado e dissolvidos em água num balão aferido de 20 mL, com o auxílio de um agitador Vortex. Foram testadas cinco concentrações ($C_1=0,4$; $C_2=0,2$; $C_3=0,1$; $C_4=0,05$ e $C_5=0,025$ mg/mL).

4. Testes de eclosão

Foram realizados testes de eclosão de cada uma das espécies de *Globodera* com os extratos obtidos de *S. sisymbriifolium* cv. Sis 6001.

Globodera pallida

Numa primeira fase foram observados os efeitos dos três extratos na eclosão de *G. pallida*.

Em cada um dos três tabuleiros de ensaio (um para PA, um para R e um para S) foram testadas cinco concentrações (0,4; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,025 mg/mL), o controlo positivo

(exsudato de *Solanum tuberosum* cv. Desirée) e o controlo negativo (água destilada); com quatro repetições para cada tratamento (Fig. 1).

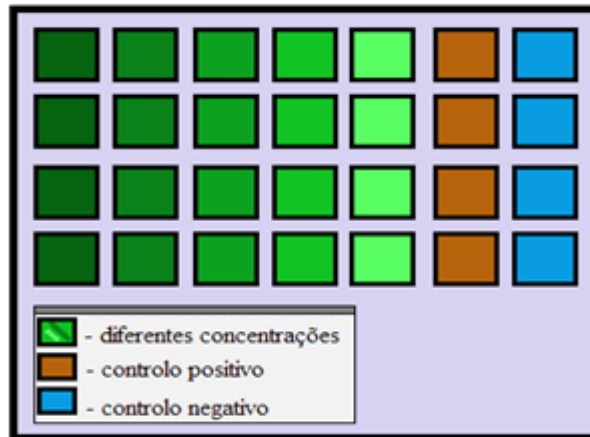


Figura 1. Imagem representativa de um dos três tabuleiros de ensaio. Os quadrados representam os blocos de vidro utilizados, e as diferentes cores as diferentes concentrações do extrato.

Foram utilizados blocos de vidro escavados esterilizados, com 15 quistos em cada bloco contendo 2 mL de extrato (Fig. 2). Os testes decorreram no escuro, numa câmara húmida, a uma temperatura de cerca de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.



Figura 2. Blocos de vidro escavados no tabuleiro de ensaio com os quistos de *G. pallida* e 2 mL do extrato/exsudato/água, ao lado do microscópio binocular esterioscópico utilizado para fazer as contagens.

Durante o ensaio observou-se que era no solo (S) que havia maior eclosão. Foi então testada qual das idades de *S. sisymbriifolium* tinha maior efeito na eclosão, se 1 mês, 2 ou 3 meses.

Foram montados três tabuleiros de ensaio, um para cada idade da planta (1M, 2M e 3M). Em cada um foram testadas as cinco concentrações (0,4; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,025

mg/mL), o controle positivo (exsudato de *S. tuberosum* cv. Desirée) e o controle negativo (água destilada); com quatro repetições cada. Procedeu-se do mesmo modo anteriormente descrito.

Após a realização deste segundo teste, foi possível concluir que era com o extrato de solo com 2 meses que havia maior eclosão. Procedeu-se então ao seu fracionamento e foram testadas as três frações obtidas a partir do extrato S2M de *S. sisymbriifolium* (FA, FB ou FC) na eclosão.

Foi montado um tabuleiro de ensaio com as três frações, o controle positivo (exsudato de *Solanum tuberosum* cv. Desirée) e o controle negativo (água destilada); com quatro repetições. Procedeu-se como descrito anteriormente.

Globodera rostochiensis

Inicialmente foram testados os efeitos dos três extratos na eclosão no isolado de *G. rostochiensis*.

Em cada um dos três tabuleiros de ensaio (um para PA, um para R e um para S) foram testadas cinco concentrações (0,4; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,025 mg/mL), o controle positivo (exsudato de *Solanum tuberosum* cv. Desirée) e o controle negativo (água destilada); com quatro repetições para cada tratamento, da mesma forma que foi realizado para *G. pallida* (Fig. 2).

A partir desta fase apenas se trabalhou com extrato de solo por ter sido o mais eficaz na eclosão. Foi então testada qual das idades de *S. sisymbriifolium* tinha maior efeito na eclosão, se 1 mês, 2 ou 3 meses. O procedimento foi idêntico ao utilizado para *G. pallida*.

Após a realização deste segundo ensaio, foi possível concluir que era no extrato de solo com 1 mês em que havia maior eclosão. Procedeu-se então ao seu fracionamento e foi testada em qual das 5 frações (FA', FB', FC', FD' ou FE') do extrato S1M de *S. sisymbriifolium* havia maior eclosão.

Foi montado um tabuleiro de ensaio com as cinco frações, o controle positivo (exsudato de *S. tuberosum* cv. Desirée) e o controle negativo (água destilada); com quatro repetições de cada. Foram utilizados blocos de vidro escavados esterilizados, com 15 quistos por bloco, com 2 mL de extrato. Os testes decorreram no escuro, numa câmara húmida, a uma temperatura de cerca de 22±2°C.

4.1. Contagem dos J2 eclodidos

As contagens do número de J2 eclodidos foram realizadas ao microscópio estereoscópico de 24 em 24h, durante 30 dias. Os J2 eclodidos foram sendo retirados do bloco de vidro, ao longo das sucessivas contagens. Depois da última contagem determinou-se a eclosão percentual cumulativa, isto é, o total de J2 eclodidos até ao último dia do teste.

Os valores da eclosão percentual cumulativa, são definidos segundo a fórmula:

$$E = \frac{100 \times \text{Média do total de J2 eclodidos}}{\text{Média dos ovos totais}}$$

em que,

▣ **E** = Eclosão cumulativa (%)

▣ **Média do total de J2 eclodidos** = [\sum J2 eclodidos em R1 + \sum J2 eclodidos em R2 + \sum J2 eclodidos em R3 + \sum J2 eclodidos em R4] / 4

▣ **R**= repetição

▣ **Média dos ovos totais** = [(\sum J2 eclodidos em R1 + N° ovos não eclodidos em R1*) + (\sum J2 eclodidos em R2 + N° ovos não eclodidos em R2*) + (\sum J2 eclodidos em R3 + N° ovos não eclodidos em R3*) + (\sum J2 eclodidos em R4 + N° ovos não eclodidos em R4*)] / 4

***DETERMINAÇÃO DO N° DE J2 NÃO ECLODIDOS:** no fim dos 30 dias os quistos foram retirados dos blocos e esmagados de modo a libertar os ovos que ainda se encontravam no seu interior (Fig. 3). Os quistos esmagados foram colocados num copo de vidro ao qual se acrescentou água até perfazer 15 mL. A seguir, foi retirado 1mL da água e feita a contagem dos J2, sendo este processo repetido três vezes. No final foi calculada a média das três contagens e o valor foi multiplicado por 15 para calcular o total de J2 que não eclodiram em cada bloco.



Figura 3. Ovo de *Globodera rostochiensis* com J2 (à esquerda) e vazio (à direita).

Para a avaliação do efeito dos extratos em cada uma das cultivares foi estabelecida uma escala, que está representada na tabela I.

Tabela I. Escala para avaliação do efeito dos extratos de *Solanum sisymbriifolium* na eclosão de *Globodera* spp.

Eclosão cumulativa (%)	Efeito do extrato
> 60	Muito estimulador
30 a 60	Estimulador
10 a 30	Pouco estimulador
< 10	Sem efeito

5. Testes de mortalidade

Foram realizados testes de mortalidade dos J2 de cada um dos isolados de *Globodera* com os extratos obtidos de *S. sisymbriifolium* da cv. Sis 6001.

Globodera pallida e *G. rostochiensis*

Foi montado um tabuleiro de ensaio com blocos de vidro escavados esterilizados, com 15 J2 em cada bloco de vidro com 2 mL de extrato. Os extratos testados foram a parte aérea (1 mês), a raiz (1 mês), o solo (2 meses para *G. pallida* e 1 mês para *G. rostochiensis*), e a fração C [do solo com 2 meses (*G. pallida*) e com 1 mês (*G. rostochiensis*)] e o controle (água destilada); com cinco repetições cada. Os testes decorreram no escuro, numa câmara húmida, a uma temperatura de cerca de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.

As frações FA e FB (do solo com 2 meses) foram testadas para *G. pallida*, e as frações FA', FB', FD' e FE' (do solo com 1 mês) para *G. rostochiensis*, do mesmo modo descrito para os extratos.

5.1. Contagem dos J2 vivos

As contagens do número de J2 vivos foram realizadas ao microscópio estereoscópico durante 8 dias, de 24 em 24h. É difícil determinar por observação direta ao microscópio estereoscópico se os J2 estão realmente mortos, sendo necessário realizar um teste de confirmação (Chen & Dickson, 2000). A cada amostra foi adicionada uma ou duas gotas

(50 a 100 μ L) de NaOH (1N), e nos 30s – 3min seguintes os nemátodes vivos começam a ter contorções e morrem. Os que permanecem imóveis são considerados mortos.

Depois da última contagem determinou-se a mortalidade percentual cumulativa, isto é, o número de J2 que morreram na totalidade do ensaio em percentagem.

Os valores da mortalidade percentual cumulativa são definidos segundo a fórmula:

$$M = \frac{100 \times \text{Média do total de J2 mortos}}{15}$$

em que,

▣ **M** = Mortalidade cumulativa (%)

▣ **Média do total de J2 mortos** = $\left[\sum \text{J2 mortos em R1} + \sum \text{J2 mortos em R2} + \sum \text{J2 mortos em R3} + \sum \text{J2 mortos em R4} + \sum \text{J2 mortos em R5} \right] / 5$

▣ **R**= repetição

Para a avaliação do efeito dos extratos em cada uma das cultivares foi estabelecida uma escala, que está representada na tabela II.

Tabela II. Escala para avaliação dos efeitos dos extratos de *Solanum sisymbriifolium* na mortalidade de *Globodera* spp.

Mortalidade cumulativa (%)	Efeito do extrato
> 60	Letal
30 a 60	Pouco letal
10 a 30	Muito pouco letal
< 10	Sem efeito

6. Fracionamento dos extratos com maior atividade

6.1. Determinação das melhores condições para o fracionamento, por recurso à cromatografia em camada fina (TLC)

Após a realização dos testes de eclosão, verificou-se que o extrato de solo com dois meses (S2M) teve maior efeito na eclosão dos J2 de *Globodera pallida*, enquanto para *G. rostochiensis* o extrato de solo com um mês (S1M) foi o mais ativo.

Para aquilatar a fase móvel mais adequada ao fracionamento destes extratos, por cromatografia em coluna, recorreu-se a outro processo cromatográfico, mais simples e rápido, a cromatografia em camada fina (TLC).

A TLC é também uma técnica cromatográfica usada na separação de compostos. O procedimento baseia-se em aplicar a amostra numa placa revestida de uma camada fina de adsorvente (fase estacionária), que depois é colocada numa câmara cromatográfica, que contém a fase móvel (eluente). O eluente desloca-se por efeito de capilaridade no sentido ascendente, separando os compostos ao longo da placa, de acordo com as suas particularidades estruturais.

Para a realização desta metodologia foram utilizadas placas de fase reversa com indicador de fluorescência (RP-18 F254, Merck), nas quais se aplicaram 10 µL de cada amostra: extrato de solo com 1 e 2 meses (dissolvendo 0,004 g de cada extrato em 1 mL de metanol 30%).

Para cada uma das amostras foram testados três eluentes: água, metanol e acetonitrilo. Após o desenvolvimento cromatográfico, eliminou-se a fase móvel e as placas foram observadas à lâmpada de UV.

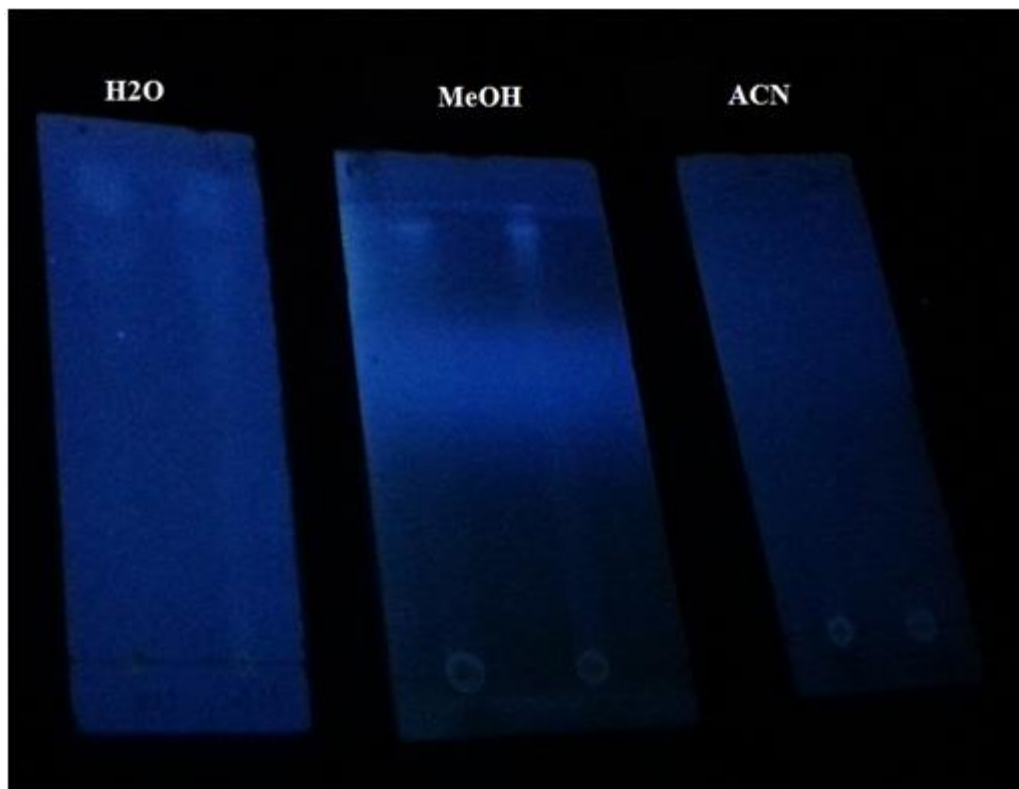


Figura 4. Visualização das placas de TLC (RP-18 F254) após desenvolvimento na câmara cromatográfica (três fases móveis: água, metanol e acetonitrilo), com duas aplicações: 10 μ L de S1M e S2M. Observação realizada aos UV a 366 nm.

Verificou-se que de entre os três, a água foi o eluente que proporcionou melhor separação dos compostos, seguido do metanol (Fig. 4). Este resultado permitiu-nos seleccionar a fase móvel a utilizar no fracionamento dos extratos, por cromatografia em coluna.

6.2. Fracionamento dos extratos por cromatografia em coluna

A cromatografia em coluna é uma técnica utilizada para a separação e purificação de compostos presentes em misturas complexas, tal como são os extratos, de acordo com a sua afinidade para a fase estacionária e fase móvel. A velocidade com a qual um determinado composto é eluído da coluna depende da sua polaridade e do eluente, assim como da sua afinidade para o adsorvente, fase estacionária (se o composto tiver maior afinidade para o adsorvente do que para o eluente, ele migrará mais lentamente na coluna).

O objetivo deste método foi fracionar o extrato em várias porções (frações) de constituição química diferente, o que foi posteriormente monitorizado por TLC.

A fim de se obterem frações em quantidade necessária aos testes de eclosão e de mortalidade, procedeu-se ao fracionamento dos extratos por cromatografia em coluna com enchimento de fase reversa, Chromabond® C18 10g/70mL (Macherey-Nagel, Düren, Germany) (Fig. 5).



Figura 5. Fracionamento por cromatografia em coluna

Globodera pallida

Para o extrato de solo de plantas de 2 meses (S2M), o qual se mostrou mais ativo para *Globodera pallida*, dissolveram-se 0,008 g em 5 mL de H₂O Milli-Q, e sonificou-se num aparelho de ultra-sons. Posteriormente, a solução foi centrifugada durante 20min., tendo-se retirado o sobrenadante (Fig. 6) para aplicar na coluna.

A coluna foi inicialmente ativada com 70 mL de metanol Lichrosolv (Merck) e, de seguida, com 70 mL de H₂O Milli-Q. Posteriormente, aplicou-se a amostra na coluna e o eluíram-se os seus constituintes inicialmente com 20 mL de H₂O Milli-Q, obtendo-se as frações F0 (3,1 mL), F1 (5,5 mL), F2 (3,2 mL), F3 (3 mL), F4 (2,9 mL) e F5 (5 mL), seguido de 20 mL de metanol, tendo-se obtido a F6 (10 mL) e F7 (10 mL).

Para monitorização do fracionamento retiraram-se 0,5 mL de cada fração, que foram concentrados num evaporador rotativo até resíduo seco. Depois, cada um desses resíduos foi redissolvido (F0 a F5 com 20 µL de MeOH 20% e 10 µL H₂O; F6 e F7 com 30 µL de

MeOH 50%), e aplicados na placa de TLC (RP-18 com indicador de fluorescência – F254, Merck) e desenvolvidas com H₂O Milli-Q.

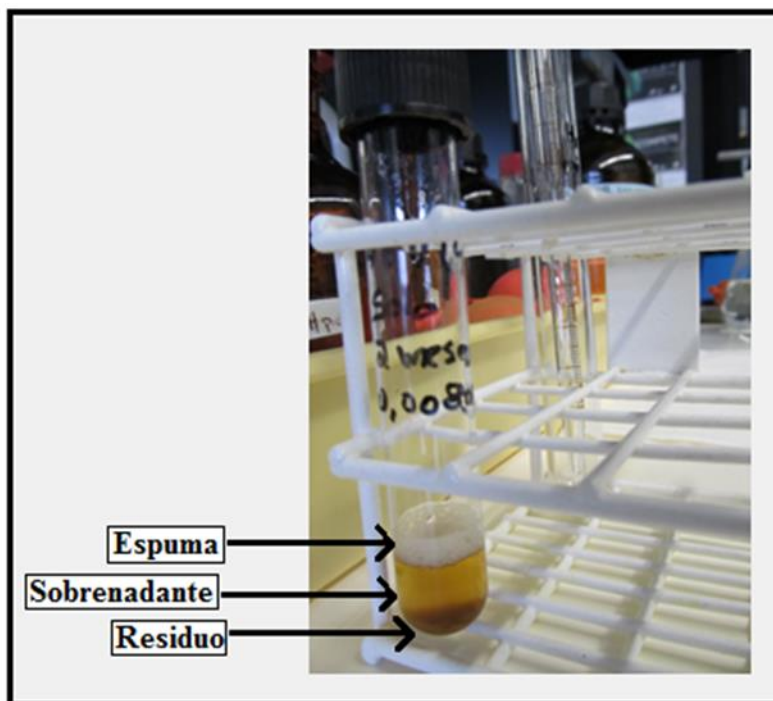


Figura 6. Tubo de ensaio com a amostra S2M após a centrifugação.

Globodera rostochiensis

Para o extrato de solo de plantas de 1 mês (S1M), o qual se mostrou mais ativo para *Globodera rostochiensis*, foram dissolvidos 0,003 g em 1 mL de metanol 30%, e a amostra sonicada num aparelho de ultra-sons. Depois foi centrifugada durante 20 min., tendo-se retirado o sobrenadante para aplicar na coluna. Após ser ativada (com 70 mL de metanol Lichrosolv, Merck, seguidos de 70 mL de H₂O Milli-Q), foi aplicada a amostra e eluída com 30 mL de H₂O Milli-Q. Assim, obtiveram-se as frações F1' (5 mL), F2' (5 mL), F3' (5 mL), F4' (5 mL), F5' (5 mL) e F6' (5 mL). De seguida aplicaram-se 15 mL de metanol 50%, originando F7' (5 mL), F8' (5 mL) e F9' (5,5 mL) e finalmente 5 mL de metanol, originando F10' (5,5 mL).

Para monitorização por TLC, foram retirados 0,5 mL de cada fração e essa porção foi concentrada num evaporador rotativo, até resíduo seco. Depois, cada resíduo foi redissolvido com 30 µL de MeOH 30% e aplicados na placa de TLC (PP-18, F254, Merck) utilizando metanol a 50% como eluente (Fig. 7).

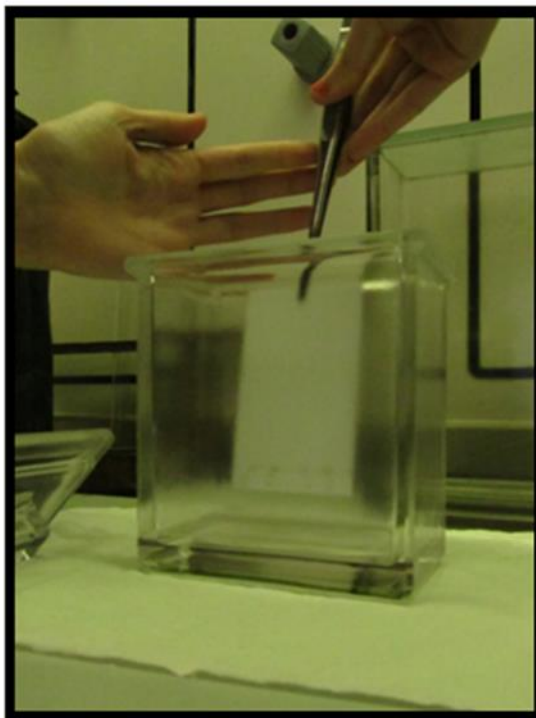


Figura 7. Colocação da placa de TLC na câmara cromatográfica.

7. Pesquisa de saponinas em *Solanum sisymbriifolium*, por cromatografia em camada fina

Este estudo foi realizado em placas de sílica G com indicador de fluorescência a 254 nm, em que a fase móvel usada foi a mistura clorofórmio-metanol-água (64:50:10) (Wagner *et al.*, 1984), para separação de saponinas. A detecção deste tipo de compostos foi efetuada com o revelador vanilina-ácido sulfúrico (VS) (Wagner *et al.*, 1984), para o qual as saponinas originam, no visível, manchas azuis ou azul violáceo e, por vezes, zonas amareladas.

Seguidamente procedeu-se à revelação das placas (Fig. 8). Este processo consistiu em pulverizar, abundantemente, as placas com a solução I (solução alcoólica de ácido sulfúrico a 5%), seguido da solução II (solução alcoólica de vanilina a 1%), e manter em estufa a 110°C durante 5-10 min. Depois de secas, as placas foram observadas ao visível e aos UV.

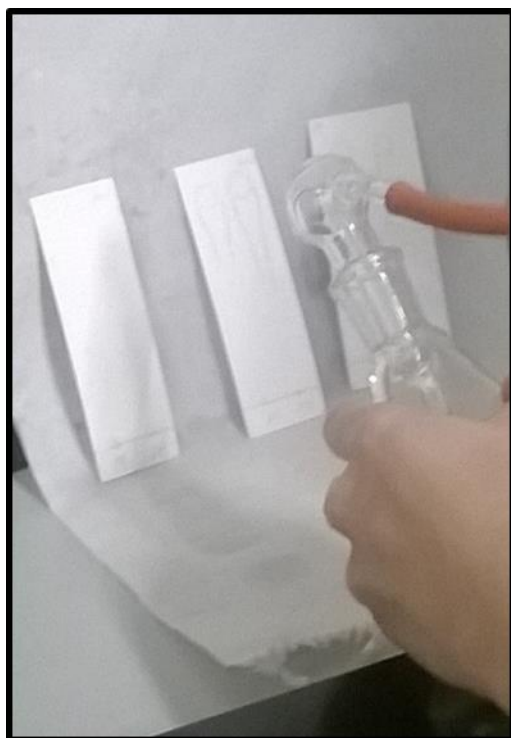


Figura 8. Processo de revelação dos constituintes químicos separados por TLC.

Utilizando as condições previamente descritas, foram cromatografados 20 μL dos extratos de: S1M (solo das plantas com 1 mês), S2M (solo das plantas com 2 meses), PA1M (parte aérea com 1 mês) e R1M (extrato de raiz com 1 mês).

III. RESULTADOS

1. Testes de eclosão

1.1. Avaliação da atividade dos extratos

Globodera pallida

Foram realizados testes de eclosão dos J2 de *G. pallida* com os extratos (PA, R e S). Durante os 30 dias de ensaio, foram registados o número de J2 que eclodiram dos ovos. Os resultados relativos à taxa de eclosão cumulativa do isolado são apresentados na tabela III.

Tabela III. Efeito dos extratos (PA, R e S) de *Solanum sisymbriifolium* cv. Sis6001 na eclosão de *Globodera pallida*, nas cinco diferentes concentrações (C1=0,4 mg/mL; C2=0,2 mg/mL; C3=0,1 mg/mL; C4=0,05 mg/mL e C5=0,025 mg/mL) e nos controlos (C-=água destilada; C+=exsudato de *S. tuberosum*).

	Parte aérea		Raiz		Solo	
	EC (%)	EC (%)*	EC (%)	EC (%)*	EC (%)	EC (%)*
C1	0,02	0,27	3,54	11,57	0,95	17,15
C2	0,05	0,67	1,82	5,95	0,68	12,27
C3	0,07	0,94	4,49	14,67	0,27	4,87
C4	0,03	0,40	2,35	7,68	0,41	7,40
C5	0,03	0,40	2,11	6,90	0,31	5,60
C-	0,04	0,54	1,53	5,0	0,34	6,14
C+	7,46	100	30,6	100	5,54	100

%EC=Percentagem de eclosão cumulativa.

%EC*=Percentagem de eclosão cumulativa corrigida segundo o controlo positivo

O extrato da parte aérea a 0,1 mg/mL (C3) foi o que teve maior efeito na eclosão (0.94%) sendo, no entanto, considerado “sem efeito”.

O extrato da raiz a 0,1 mg/mL (C3) foi o que teve maior efeito na eclosão (14.67%) sendo “pouco estimulador” da eclosão.

Por último, o extrato do solo a 0,4 mg/mL (C1) foi o que provocou maior eclosão (17.15%), sendo considerado também “pouco estimulador” (tabela I).

Dos três extratos testados foi o extrato de solo que teve maior efeito na eclosão dos J2 (Fig. 9).

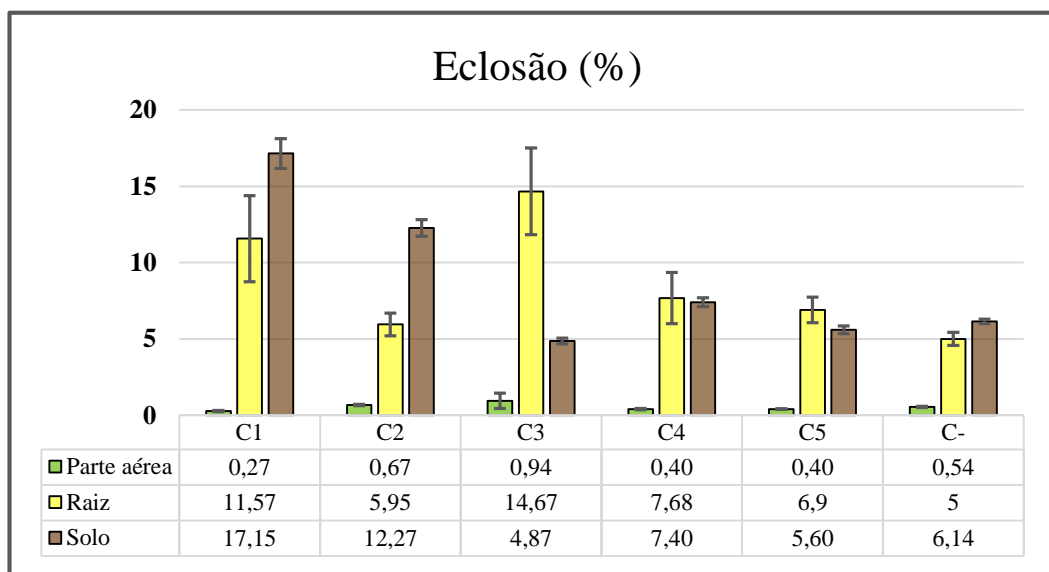


Figura 9. Taxa de eclosão cumulativa de jovens do segundo estágio de *Globodera pallida* em 30 dias de exposição a 5 concentrações de extrato de solo, raiz e parte aérea (C1=0,4 mg/mL; C2=0,2 mg/mL; C3=0,1 mg/mL; C4=0,05 mg/mL e C5=0,025 mg/mL) de *Solanum sisymbriifolium* cv. Sis 6001 com 1 mês e água destilada como controlo negativo. Os resultados são a média das 4 repetições e corrigidos em relação ao controlo positivo *S. tuberosum*, cv. Désirée. As barras representam o desvio padrão.

Após esta primeira fase, foi estudada a influência do estágio de desenvolvimento da planta de *S. sisymbriifolium* no efeito da eclosão, nomeadamente em plantas de 1 mês, 2 e 3 meses (S1M, S2M e S3M, respetivamente). Os resultados relativos à taxa de eclosão cumulativa do isolado após os 30 dias são apresentados na tabela IV.

Tabela IV. Efeito dos extratos (S1M, S2M e S3M) de *Solanum sisymbriifolium* cv. Sis6001 na eclosão de *Globodera pallida*, nas cinco diferentes concentrações (C1=0,4 mg/mL; C2=0,2 mg/mL; C3=0,1 mg/mL; C4=0,05 mg/mL e C5=0,025 mg/mL) e nos controlos (C-=água destilada; C+=exsudato de *S. tuberosum*).

	Solo 1M		Solo 2M		Solo 3M	
	EC (%)	EC (%)*	EC (%)	EC (%)*	EC (%)	EC (%)*
C1	0,95	17,15	25,49	74,58	2,91	14,54
C2	0,68	12,27	17,07	49,94	3,42	17,08
C3	0,27	4,87	19,09	55,85	4,29	21,43
C4	0,41	7,40	10,3	30,13	1,78	8,89
C5	0,31	5,60	11,76	34,41	0,45	2,25
C-	0,34	6,14	1,24	3,63	0,07	0,35
C+	5,54	100	34,18	100	20,02	100

%EC=Percentagem de eclosão cumulativa.

%EC*=Percentagem de eclosão cumulativa corrigida segundo o controlo positivo

O extrato S1M a 0,4 mg/mL (C1) foi onde se observou maior percentagem de eclosão (17,15%) sendo “pouco estimulador”.

O extrato S2M a 0,4 mg/mL (C1) foi onde se observou maior percentagem de eclosão (74,58%) sendo por isso considerado “muito estimulador” da eclosão.

O extrato S3M a 0,1 mg/mL (C3) foi onde se observou maior percentagem de eclosão (21,43%), sendo considerado, no entanto, “pouco estimulador” (tabela I).

Dos três extratos testados foi verificado que o extrato de *S. sisymbriifolium* que teve maior efeito na eclosão foi o S2M, a 0,4 mg/mL (C1) (Fig. 10).

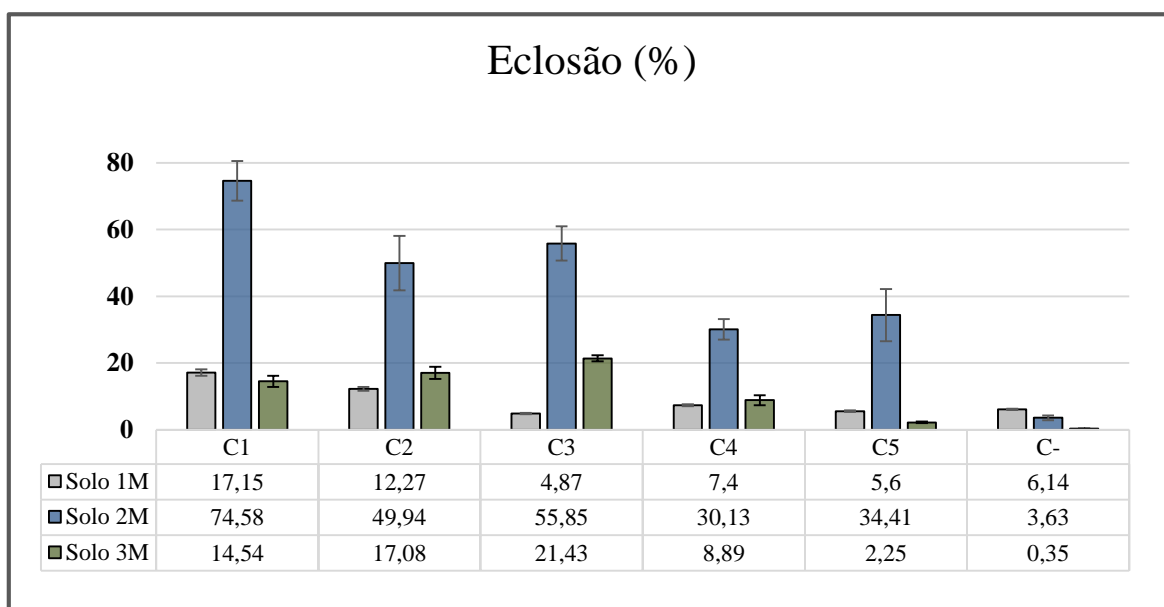


Figura 10. Taxa de eclosão cumulativa de jovens do segundo estágio de *Gloeodera pallida* em 30 dias de exposição a 5 concentrações de extrato de solo com 1, 2 e 3 meses (1M, 2M e 3M) (C1=0,4 mg/mL; C2=0,2 mg/mL; C3=0,1 mg/mL; C4=0,05 mg/mL e C5=0,025 mg/mL de *Solanum sisymbriifolium* cv. Sis 6001 e água destilada como controlo negativo. Os resultados são a média das 4 repetições e corrigidos em relação ao controlo positivo *S. tuberosum*, cv. Désirée. As barras representam o desvio padrão.

Gloeodera rostochiensis

Foram realizados testes de eclosão dos J2 de *G. rostochiensis* com os extratos (PA, R e S). Os resultados relativos à taxa de eclosão cumulativa do isolado são apresentados na tabela V.

Tabela V. Efeito dos extratos (PA, R e S) de 1 mês de *Solanum sisymbriifolium* cv. Sis6001 na eclosão de *Globodera rostochiensis*, nas cinco diferentes concentrações (C1=0,4 mg/mL; C2=0,2 mg/mL; C3=0,1 mg/mL; C4=0,05 mg/mL e C5=0,025 mg/mL) e nos controles (C-=água destilada; C+=exsudato de *S. tuberosum*).

	Parte aérea		Raiz		Solo	
	EC (%)	EC (%)*	EC (%)	EC (%)*	EC (%)	EC (%)*
C1	0,29	2,03	5,75	7,48	9,39	69,15
C2	0,53	3,71	3,78	4,92	5,30	39,03
C3	0,49	3,43	2,66	3,46	8,65	63,7
C4	0,26	1,82	2,02	2,63	4,59	33,8
C5	0,44	3,08	2,56	3,33	2,55	18,78
C-	0,73	5,11	4,03	5,24	0,75	5,52
C+	14,29	100	76,87	100	13,58	100

%EC=Percentagem de eclosão cumulativa.

%EC*=Percentagem de eclosão cumulativa corrigida segundo o controle positivo

O extrato PA a 0,2 mg/mL (C2) teve maior efeito na eclosão (3,71%), sendo considerado, no entanto, “sem efeito”.

O extrato R a 0,4 mg/mL (C1) foi o que teve maior efeito na eclosão (7,48%) embora segundo a tabela I seja considerado como “sem efeito”.

O extrato S a 0,4 mg/mL (C1) foi o que provocou maior eclosão (69,15%) sendo considerado “muito estimulador”.

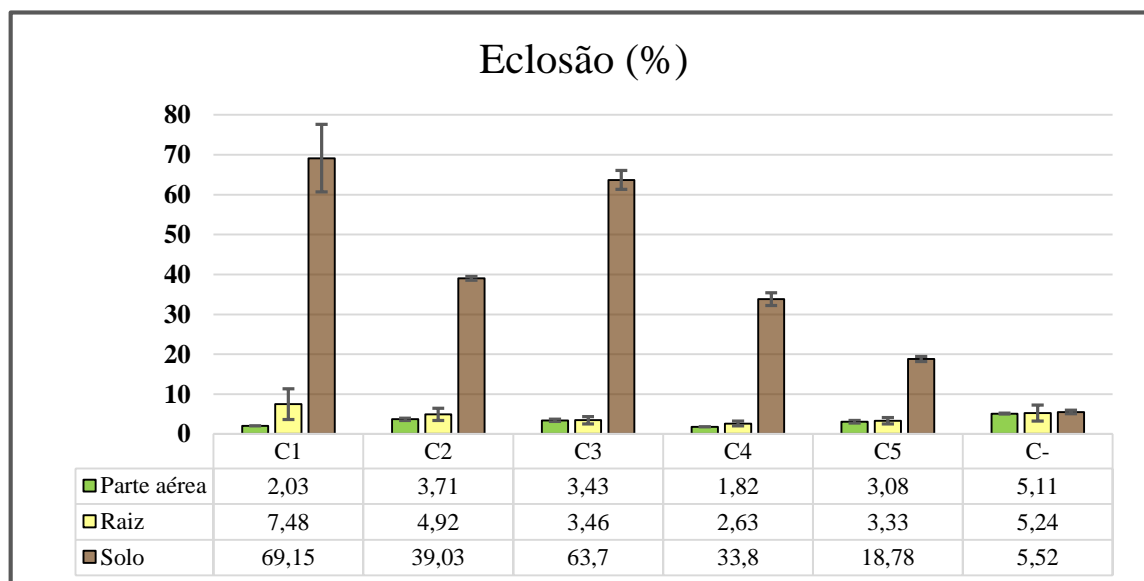


Figura 11. Taxa de eclosão cumulativa de jovens do segundo estágio de *Globodera rostochiensis* em 30 dias de exposição a 5 concentrações de extrato de solo, raiz e parte aérea (C1=0,4 mg/mL; C2=0,2 mg/mL;

C3=0,1 mg/mL; C4=0,05 mg/mL e C5=0,025 mg/mL) de *Solanum sisymbriifolium* cv. Sis 6001 com 1 mês e água destilada como controlo negativo. Os resultados são a média das 4 repetições e corrigidos em relação ao controlo positivo *S. tuberosum*, cv. Désirée. As barras representam o desvio padrão.

Verificou-se que não existem grandes diferenças entre as cinco concentrações dos extratos. No entanto, a maior eclosão de J2 desta espécie foi observada para o extrato do solo (Fig. 11).

A seguir apresentam-se os resultados do efeito do desenvolvimento da planta, extratos S1M, S2M e S3M, na eclosão do isolado de *G. rostochiensis* (Tabela VI).

Tabela VI. Efeito dos extratos (S1M, S2M e S3M) de *Solanum sisymbriifolium* cv. Sis6001 na eclosão de *Globodera rostochiensis* nas cinco diferentes concentrações (C1=0,4 mg/mL; C2=0,2 mg/mL; C3=0,1 mg/mL; C4=0,05 mg/mL e C5=0,025 mg/mL) e nos controlos (C-=água destilada; C+=exsudato de *S. tuberosum*).

	Solo 1M		Solo 2M		Solo 3M	
	EC (%)	EC (%)*	EC (%)	EC (%)*	EC (%)	EC (%)*
C1	9,39	69,15	25,5	54,52	4,84	13,4
C2	5,30	39,03	13,36	28,57	1,29	3,57
C3	8,65	63,70	13,34	28,52	3,25	9
C4	4,59	33,80	17,35	37,1	0,79	2,19
C5	2,55	18,78	11,94	25,53	0,42	1,16
C-	0,75	5,52	1,16	2,48	0,25	0,69
C+	13,58	100,00	46,77	100	36,13	100

%EC=Porcentagem de eclosão cumulativa.

%EC*=Porcentagem de eclosão cumulativa corrigida segundo o controlo positivo

O extrato S1M a 0,4 mg/mL (C1) foi o que teve maior efeito na eclosão (69,15%), sendo “muito estimulador”.

O extrato S2M a 0,4 mg/mL (C1) foi o que provocou maior eclosão (54,52%), sendo considerado “estimulador”.

O extrato S3M a 0,4 mg/mL (C1) foi o que teve maior efeito na eclosão (13,4%), sendo, no entanto, “pouco estimulador” (tabela I).

De todos os extratos testados observou-se que o extrato de *S. sisymbriifolium* que originou maior taxa de eclosão dos J2 de *G. rostochiensis* foi o S1M a 0,4 mg/mL (C1) (Fig. 12).

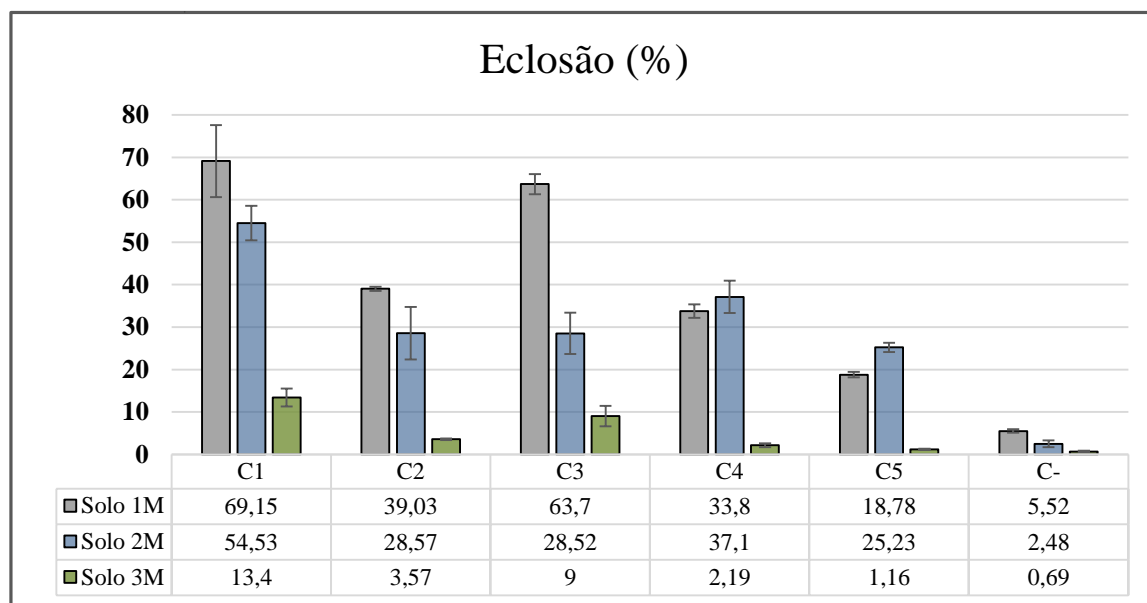


Figura 12. Taxa de eclosão cumulativa de jovens do segundo estágio de *Globdora rostochiensis* em 30 dias de exposição a 5 concentrações de extrato de solo com 1, 2 e 3 meses (C1=0,4 mg/mL; C2=0,2 mg/mL; C3=0,1 mg/mL; C4=0,05 mg/mL e C5=0,025 mg/mL) de *Solanum sisymbriifolium* cv. Sis 6001 e água destilada como controlo negativo. Os resultados são a média das 4 repetições e corrigidos em relação ao controlo positivo *S. tuberosum*, cv. Désirée. As barras representam o desvio padrão.

1.2. Avaliação da atividade das frações

Globdora pallida

A amostra mais ativa na eclosão para esta espécie foi o extrato de solo de plantas com 2 meses (S2M), pelo que se procedeu ao seu fracionamento por coluna com enchimento de fase reversa, originando as frações F0, F1, F2, F3, F4, F5, F6 e F7 (Fig. 13).

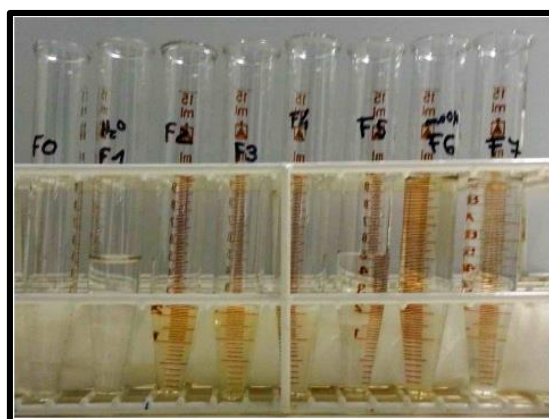


Figura 13. Ilustração das frações obtidas. F0, F1, F2, F3, F4 e F5 foram eluídas com H₂O Milli-Q e F6 e F7 com metanol.

Os perfis cromatográficos de cada fração, após separação por TLC encontram-se nas figuras 14, 15 e 16.

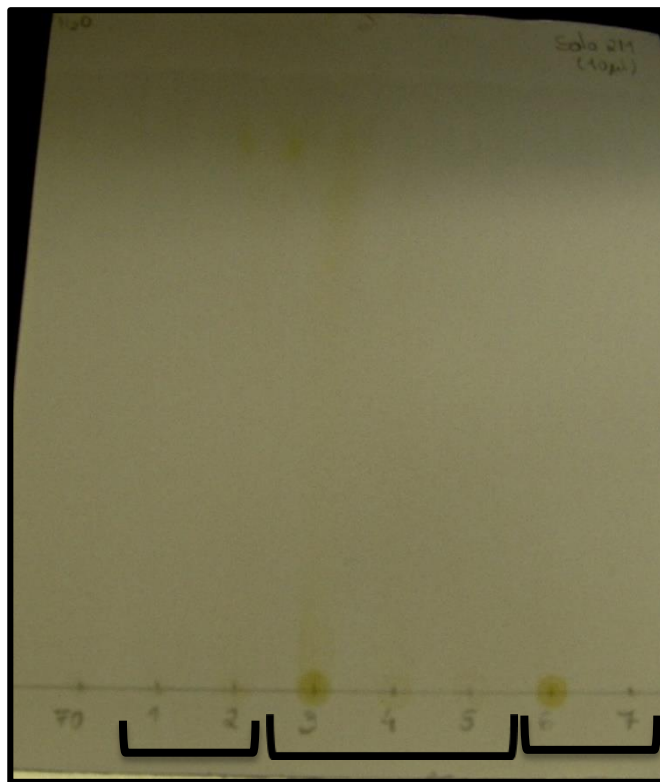


Figura 14. Visualização, à luz visível, do cromatograma resultante do desenvolvimento em placa de fase reversa, RP-18 F254, com a água como eluente. As chavetas a preto delimitam as frações que devido às suas características cromatográficas foram reunidas.

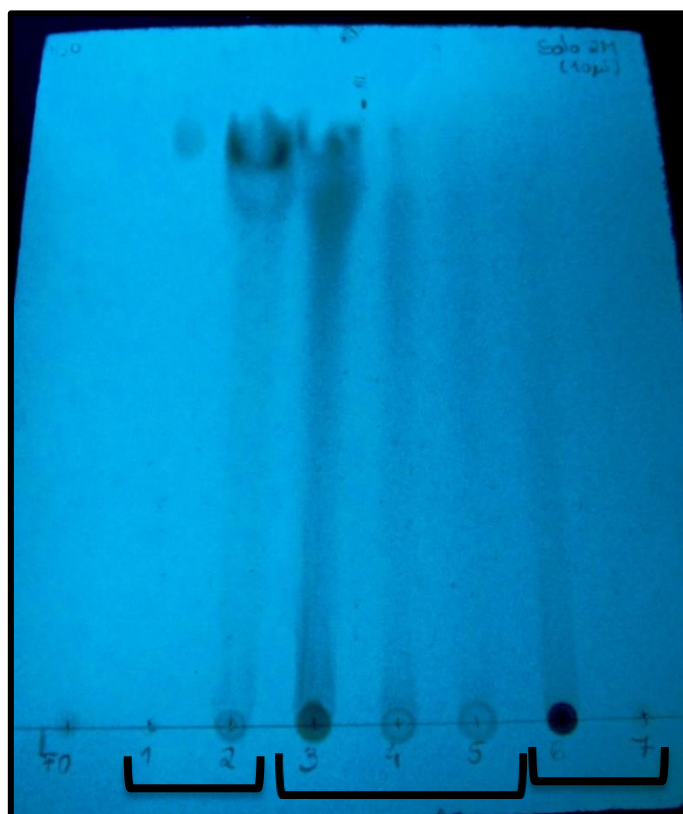


Figura 15. Visualização, aos UV a 254 nm, do cromatograma resultante do desenvolvimento em placa de fase reversa, RP-18 F254, com a água como eluente. As chavetas a preto delimitam as frações que devido às suas características cromatográficas foram reunidas.

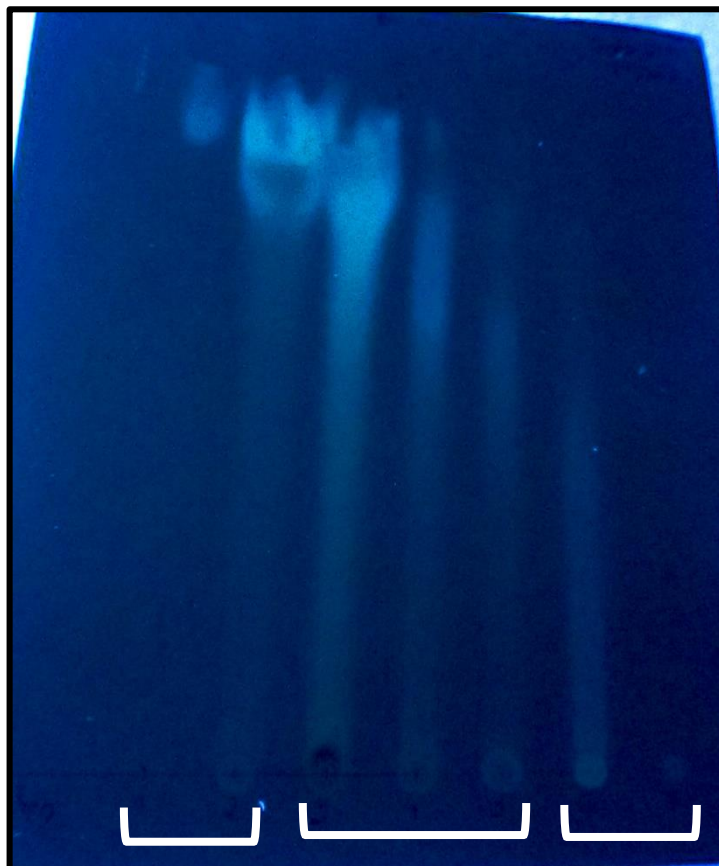


Figura 16. Visualização, aos UV a 366 nm, do cromatograma resultante do desenvolvimento em placa de fase reversa, RP-18 F254, com a água como eluente. As chavetas a branco delimitam as frações que devido às suas características cromatográficas foram reunidas.

As frações com idênticas características cromatográficas foram reunidas, assim:

- F0 foi eliminada
- F1 + F2 originou **FA**
- F3 + F4 + F5 originou **FB**
- F6 + F7 originou **FC**.

Posteriormente, a fração C (fração metanólica) teve de ser concentrada no evaporador rotativo, para a remoção do metanol e redissolvida em 10 mL de água. Este procedimento teve como objetivo a eliminação do solvente orgânico que poderia interferir, devido à sua

toxicidade, no teste com os nemátodes. Os volumes das frações FA e FB foram também aferidos para os 10 mL.

Após o fracionamento de S2M de *S. sisymbriifolium* foi testada qual das suas frações tinha maior efeito na eclosão. Os resultados relativos à taxa de eclosão cumulativa dos isolados após os 30 dias são apresentados na tabela VII.

Tabela VII. Efeito das frações do extrato de solo com 2 meses de *Solanum sisymbriifolium* cv. Sis6001 e dos controlos (C- = água destilada; C+ = exsudato de *S. tuberosum* cv. Désirée) na eclosão de *Globodera pallida*.

	Frações [S2M]	
	EC (%)	EC (%)*
FA	2,4	24,24
FB	4,7	47,56
FC	13,0	134,62
C-	2,3	23,32
C+	9,8	100

%EC=Percentagem de eclosão cumulativa.

%EC*=Percentagem de eclosão cumulativa corrigida segundo o controlo positivo

A fração C, do extrato de solo com 2 meses, foi a que teve maior efeito na eclosão (134,62%) (Fig. 17). Esta fração é “muito estimuladora” da eclosão. Por sua vez, as frações A e B têm um menor efeito na eclosão, sendo consideradas “pouco estimuladoras” (tabela I).

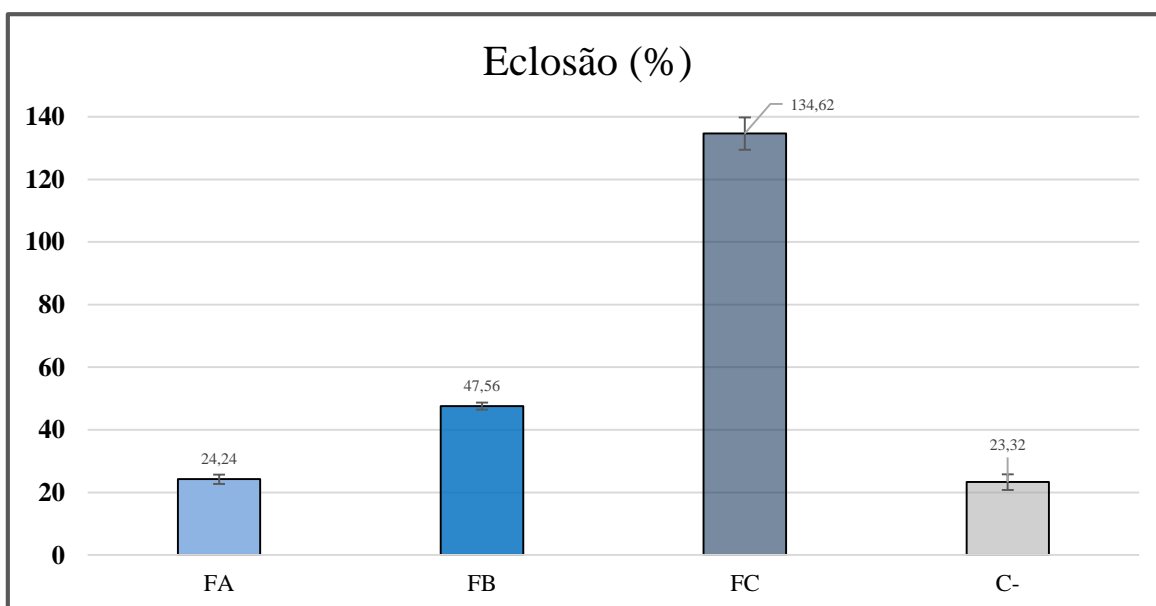


Figura 17. Taxa de eclosão cumulativa de jovens do segundo estágio de *Globodera pallida* em 30 dias de exposição a 3 frações de extrato de solo com 2 meses de *Solanum sisymbriifolium* cv. Sis 6001 e água destilada como controlo negativo. Os resultados são a média das 4 repetições e corrigidos em relação ao controlo positivo *S. tuberosum* cv. Désirée. As barras representam o desvio padrão.

Globodera rostochiensis

A amostra mais ativa na eclosão para esta espécie foi o extrato de solo com 1 mês (S1M), pelo que se procedeu ao seu fracionamento por coluna com enchimento de fase reversa, originando as frações F1', F2', F3', F4', F5', F6', F7', F8', F9' e F10'.

Ilustram-se os perfis cromatográficos de cada fração obtida (Fig. 18 e 19).

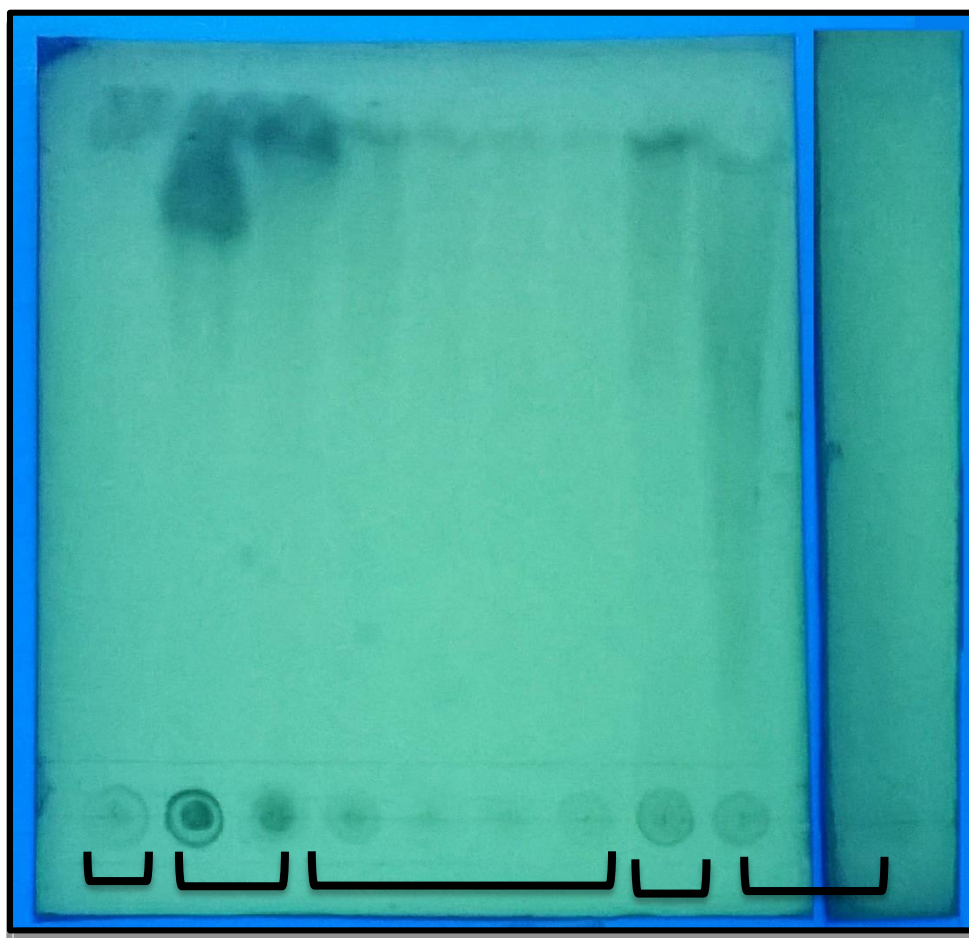


Figura 18. Visualização, aos UV a 254 nm, do cromatograma resultante do desenvolvimento em placa de fase reversa, RP-18 F254, com a metanol a 50% como eluente. As chavetas a preto delimitam as frações que devido às suas características cromatográficas foram reunidas.

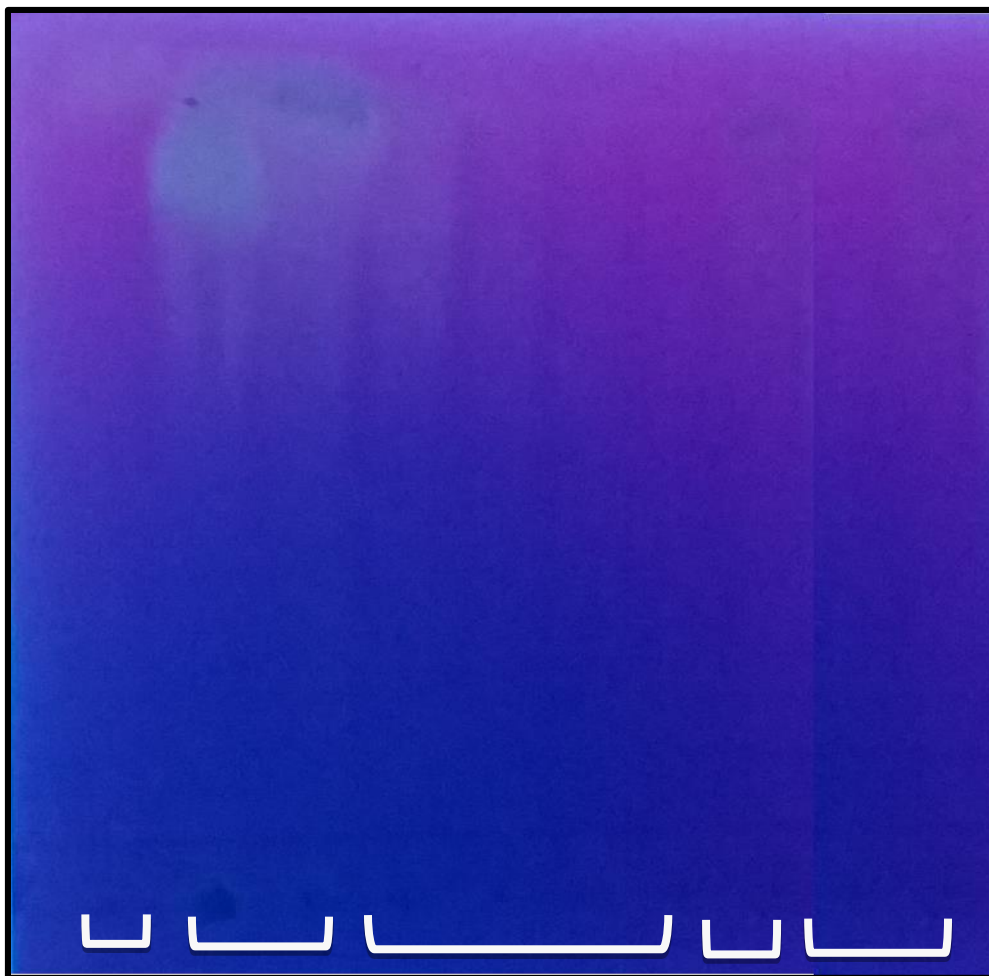


Figura 19. Visualização, aos UV a 366 nm, do cromatograma resultante do desenvolvimento em placa de fase reversa, RP-18 F254, com metanol a 50% como eluente. As chavetas a branco delimitam as frações que devido às suas características cromatográficas foram reunidas.

As frações com comportamentos idênticos foram reunidas, assim:

- F1' originou **FA'**
- F2' + F3' originou **FB'**
- F4' + F5' + F6' + F7' originou **FC'**
- F8' originou **FD'**
- F9' + F10' originou **FE'**

As frações metanólicas FC', FD' e FE' tiveram de ser concentradas no evaporador rotativo e redissolvidas em 10 mL de água para poderem ser testadas nos nemátodes sem a presença do metanol. O volume das frações FA' e FB' foi igualmente aferido para o volume de 10 mL.

Os resultados de eclosão de J2 de *G. rostochiensis* das frações de S1M (FA', FB', FC', FD' ou FE') são apresentados na tabela VIII.

Tabela VIII. Efeito das frações do extrato de solo com 1 mês de *Solanum sisymbriifolium* cv. Sis6001 e dos controlos (C- = água destilada; C+ = exsudato de *S. tuberosum* cv. Désirée) na eclosão de *Globodera rostochiensis*.

	Frações [S1M]	
	EC (%)	EC (%)*
FA'	2,70	7,50
FB'	6,48	18,00
FC'	15,49	43,00
FD'	6,70	18,60
FE'	6,99	19,40
C-	2,39	6,6
C+	35,99	100

%EC=Porcentagem de eclosão cumulativa.

%EC*=Porcentagem de eclosão cumulativa corrigida segundo o controlo positivo

A fração C' (FC') foi onde se observou maior percentagem de eclosão (43%), sendo considerado “estimulador”. A fração A foi a que teve menos efeito na eclosão (“sem efeito”) e as frações B', D' e E' tiveram algum efeito (“pouco estimulador”) (Fig. 20).

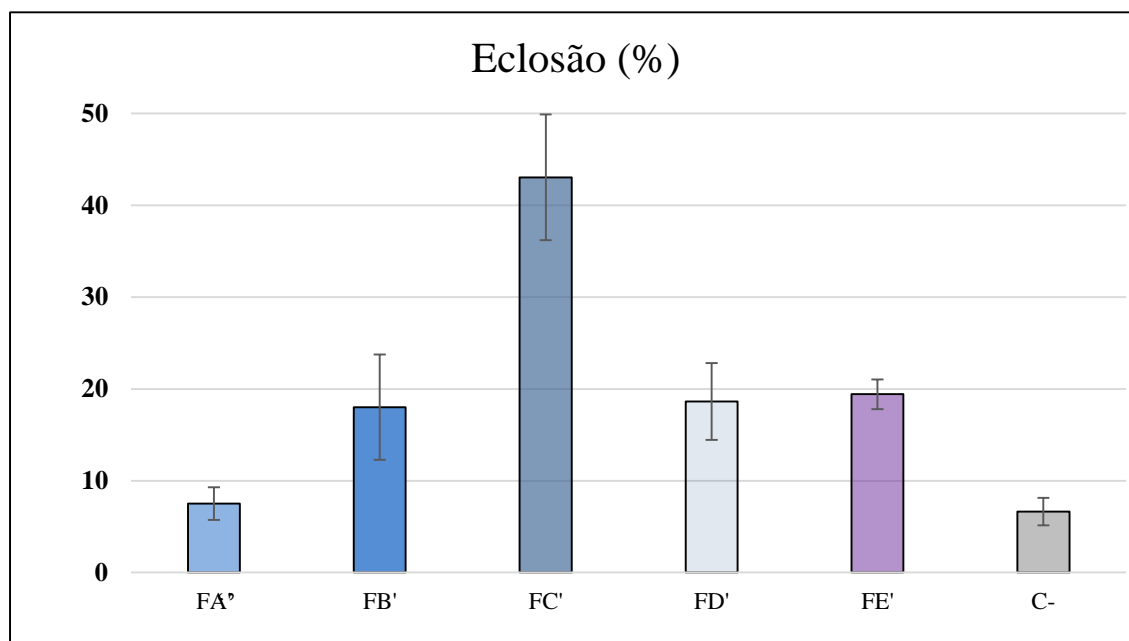


Figura 20. Taxa de eclosão cumulativa de jovens do segundo estágio de *Globodera rostochiensis* em 30 dias de exposição a 5 frações de extrato de solo com 1 mês de *Solanum sisymbriifolium* cv. Sis 6001 e

água destilada como controlo negativo. Os resultados são a média das 4 repetições e corrigidos em relação ao controlo positivo *S. tuberosum*, cv. Désirée. As barras representam o desvio padrão.

2. Testes de mortalidade

Globodera pallida

Foram realizados testes de mortalidade dos J2 de *G. pallida* com os extratos de plantas com um mês e de solo com dois meses (PA, R e S, respetivamente) e a fração C de solo de plantas com dois meses (S2M). Após os 8 dias de ensaio, foi registado o número de J2 mortos. Os resultados relativos à taxa de mortalidade do isolado são apresentados na figura 21.

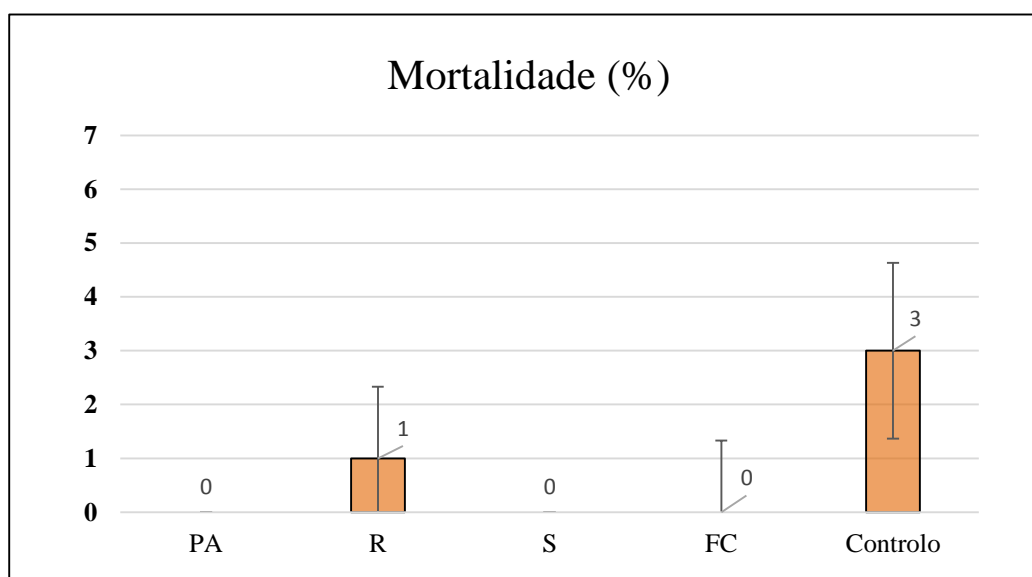


Figura 21. Taxa de mortalidade cumulativa dos jovens do segundo estágio de *Globodera pallida* ao fim de 8 dias de exposição a extrato de parte aérea (1 mês), de raiz (1 mês) e de solo (2 meses) de concentração de 0,4 mg/mL de *Solanum sisymbriifolium* cv Sis 6001, FC do extrato de solo com 2 meses de *S. sisymbriifolium* e água destilada (controlo). Os resultados são a média das cinco repetições. As barras representam o erro padrão e o número corresponde ao valor percentual exato.

Os extratos de *S. sisymbriifolium*, assim como a fração C do S2M, não aparentam ter efeito na mortalidade dos J2 de *G. pallida* (Fig. 21, Tabela II).

De seguida realizaram-se testes de mortalidade dos J2 de *G. pallida* com as restantes frações de S2M (FA e FB). Os resultados de mortalidade relativos às frações após os 8 dias são apresentados na figura 22.

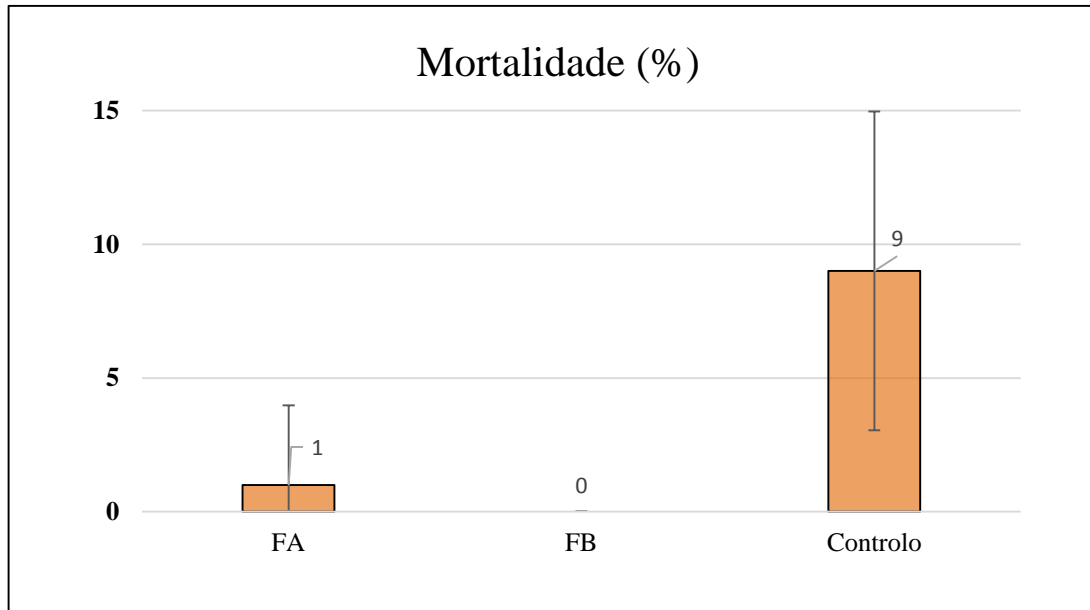


Figura 22. Taxa de mortalidade dos jovens do segundo estágio de *Globodera pallida* ao fim de 8 dias de exposição às frações FA e FB do extrato de solo de 2 meses de *S. sisymbriifolium* e água destilada (controlo). Os resultados são a média das cinco repetições. As barras representam o erro padrão e o número corresponde ao valor percentual exato.

Foi verificado que as frações A e B de *S. sisymbriifolium* também não tiveram efeito na mortalidade dos J2 de *G. pallida* (Fig. 22, Tabela II).

Globodera rostochiensis

Foram realizados testes de mortalidade dos J2 de *G. rostochiensis* com os extratos de plantas com um mês e respectivo solo (PA, R e S) e a fração C' de S1M. Os resultados relativos à mortalidade do isolado após os 8 dias são apresentados na figura 23.

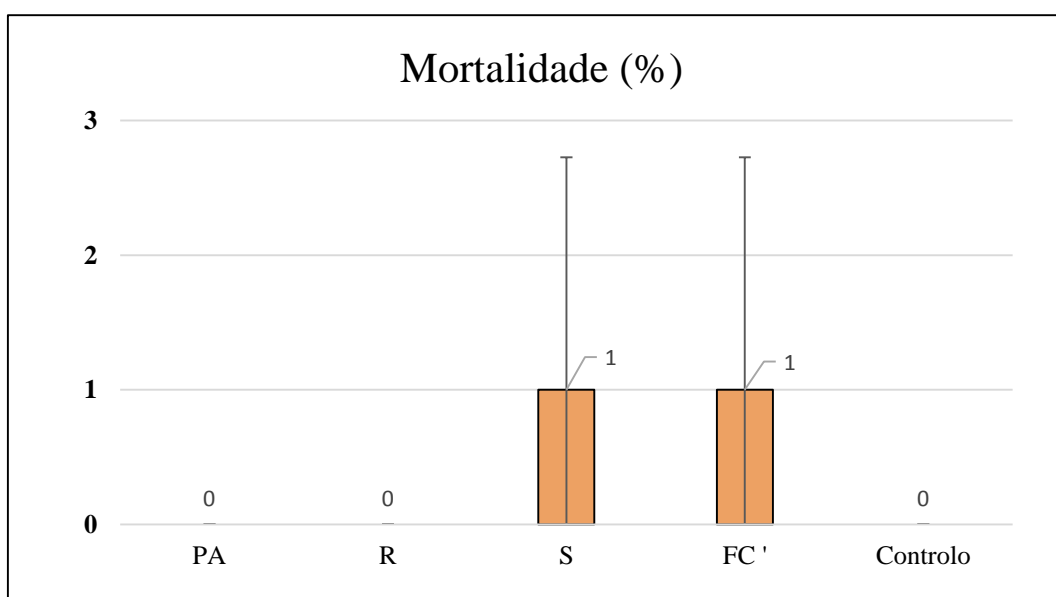


Figura 23. Taxa de mortalidade dos jovens do segundo estágio de *Globodera rostochiensis* ao fim de 8 dias de exposição a extrato de parte aérea (1 mês), de raiz (1 mês) e de solo (1 mês) de *Solanum sisymbriifolium* cv. Sis 6001, FC' do extrato de solo com 1 mês de *S. sisymbriifolium* e água destilada (controlo). Os resultados são a média das cinco repetições. As barras representam o erro padrão e o número corresponde ao valor percentual exato.

Os extratos de *S. sisymbriifolium*, assim como a fração C' do S1M, não tiveram efeito na mortalidade dos J2 de *G. rostochiensis* (Fig. 23, Tabela II).

Paralelamente realizaram-se testes de mortalidade dos J2 de *G. rostochiensis* com as restantes frações de S1M (FA', FB', FD' e FE'). Os resultados de mortalidade relativos às frações após os 8 dias são apresentados na figura 24.

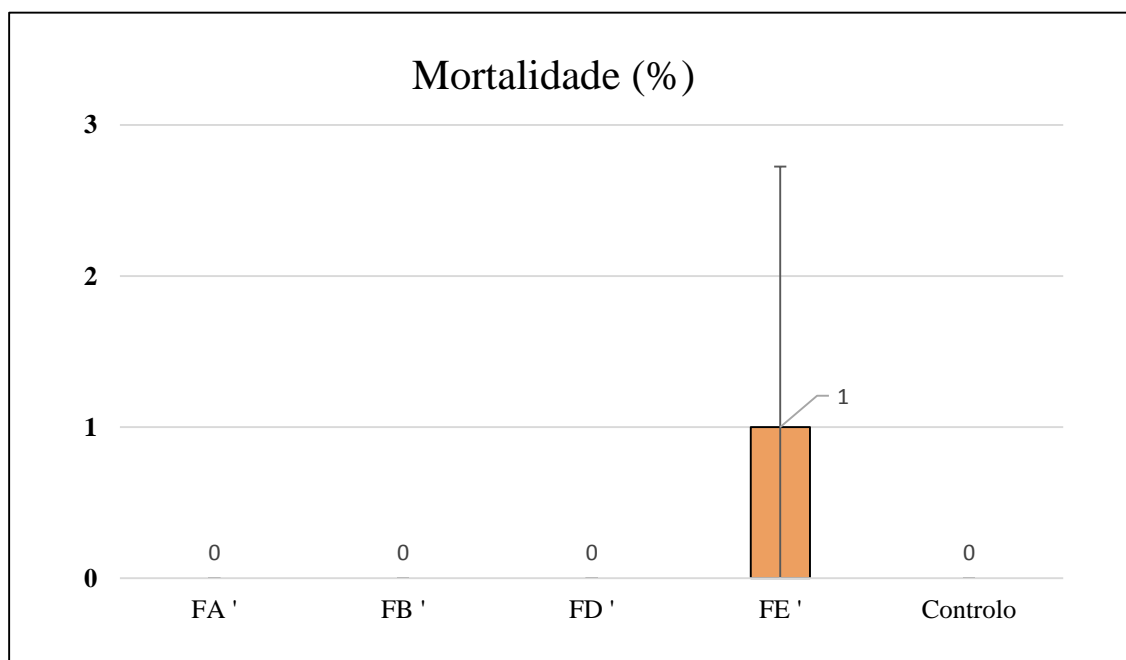


Figura 24. Taxa de mortalidade dos jovens do segundo estágio de *Globodera rostochiensis* ao fim de 8 dias de exposição às frações FA', FB', FD' e FE' do extrato de solo com 1 mês de *S. sisymbriifolium* e água destilada (controlo). Os resultados são a média das cinco repetições. As barras representam o erro padrão e o número corresponde ao valor percentual exato.

As frações A', B', D' e E' de S1M de *S. sisymbriifolium* não tiveram qualquer efeito na mortalidade dos J2 de *G. rostochiensis* (Fig. 24, Tabela II).

3. Pesquisa de saponinas nos extratos S1M, S2M, PA1M e R1M

A pesquisa de saponinas foi efetuada por cromatografia em camada fina de acordo com Wagner *et al.*, (1984). A revelação com a vanilina-ácido sulfúrico evidenciou compostos que tiveram um comportamento comum ao dos saponósidos, assinalados com um +, mas que são distintos daqueles detetados quer ao visível, quer aos UV (figura 25). Estes resultados indicam a presença de saponinas no extrato de solo.

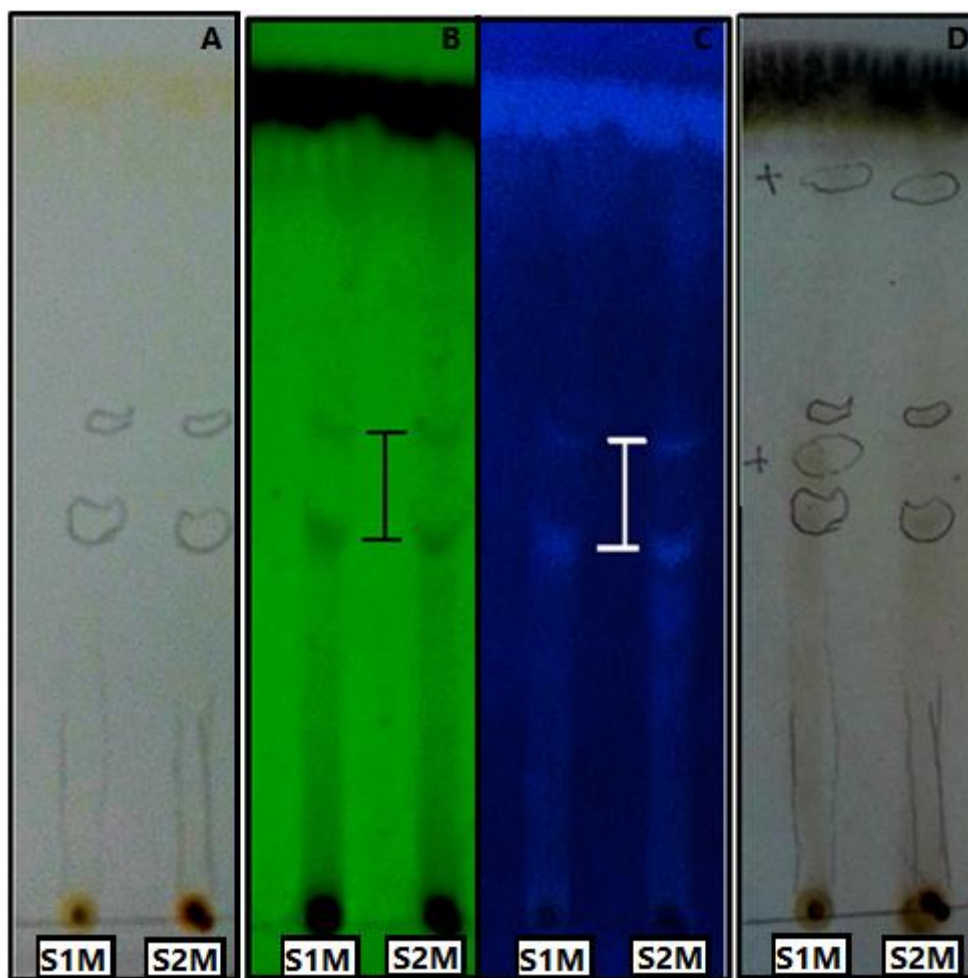


Figura 25. Visualização das placas de TLC, de fase reversa com indicador de fluorescência a 254 nm, após duas aplicações (20 μ L de S1M e S2M) e desenvolvimento com clorofórmio-metanol-água (64:50:10) como fase móvel. Observação realizada à luz visível (A), aos UV a 254 nm (B) e a 366 nm (C) antes da revelação; e depois da revelação com vanilina-ácido sulfúrico, à luz visível (D).

De seguida, foi realizada outra TLC nas mesmas condições com extrato da parte aérea e de raiz com 1 mês (PA1M e R1M) (Fig. 26). Depois de observados os resultados, foi feita a revelação da placa com a vanilina-ácido sulfúrico (Fig. 27).

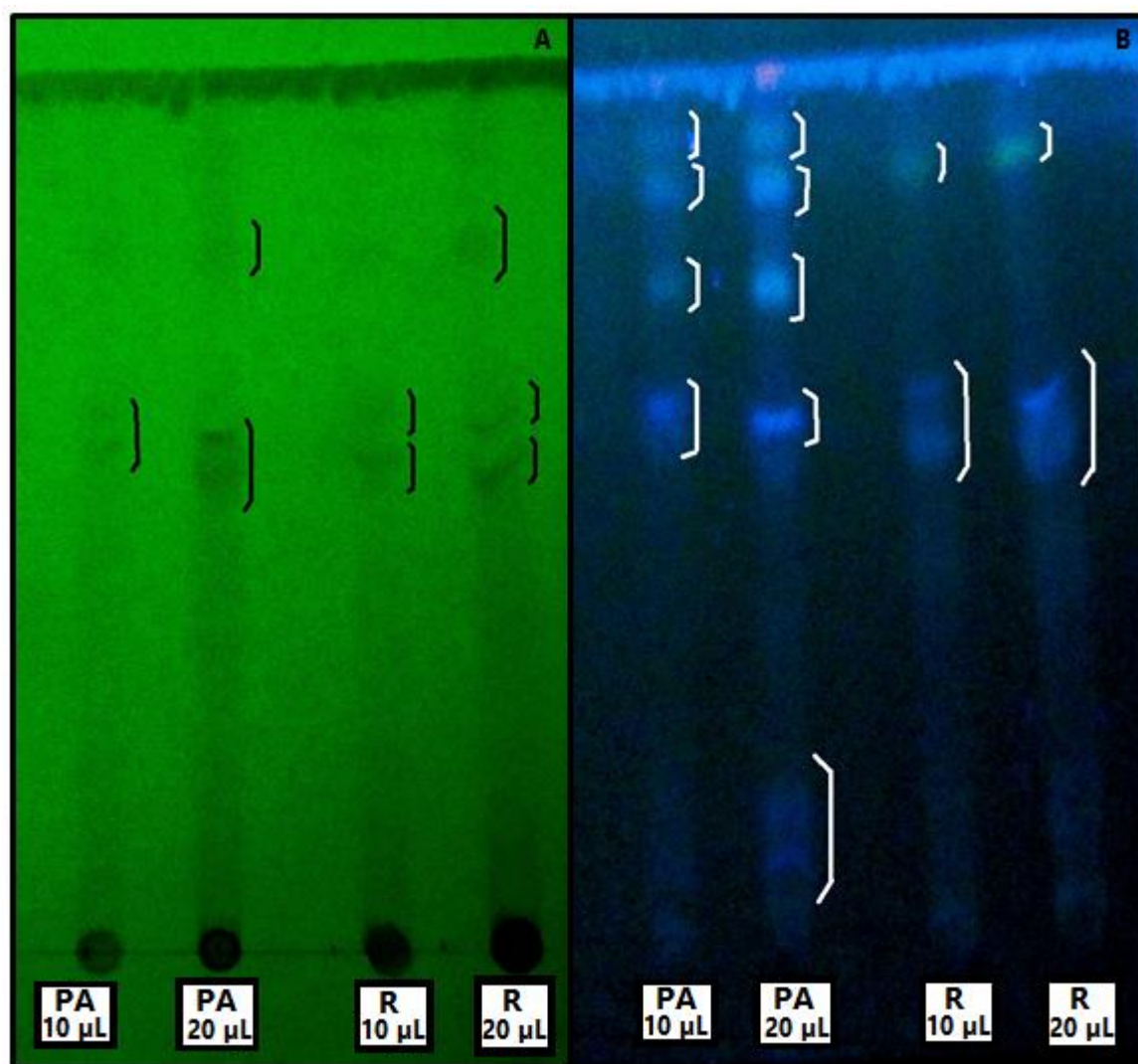


Figura 26. Visualização das placas de TLC, de fase reversa com indicador de fluorescência a 254 nm, após quatro aplicações (10 μ L e 20 μ L de PA1M e de R1M) e desenvolvimento com clorofórmio-metanol-água (64:50:10) como fase móvel. Observação realizada aos UV a 254 nm (A) e a 366 nm (B).

Aqui as manchas são diferentes das observadas no extrato de solo, o que permite inferir que estes extratos possuem uma constituição química diferente da do solo.

Depois da revelação apareceram várias manchas castanhas amareladas e violeta muito escuro, algumas das quais podem corresponder à presença de saponinas. Foi também evidente que a parte aérea e a raiz têm muitos compostos em comum pois possuem o mesmo comportamento cromatográfico (R_f) e relativamente ao revelador usado (Fig. 27).

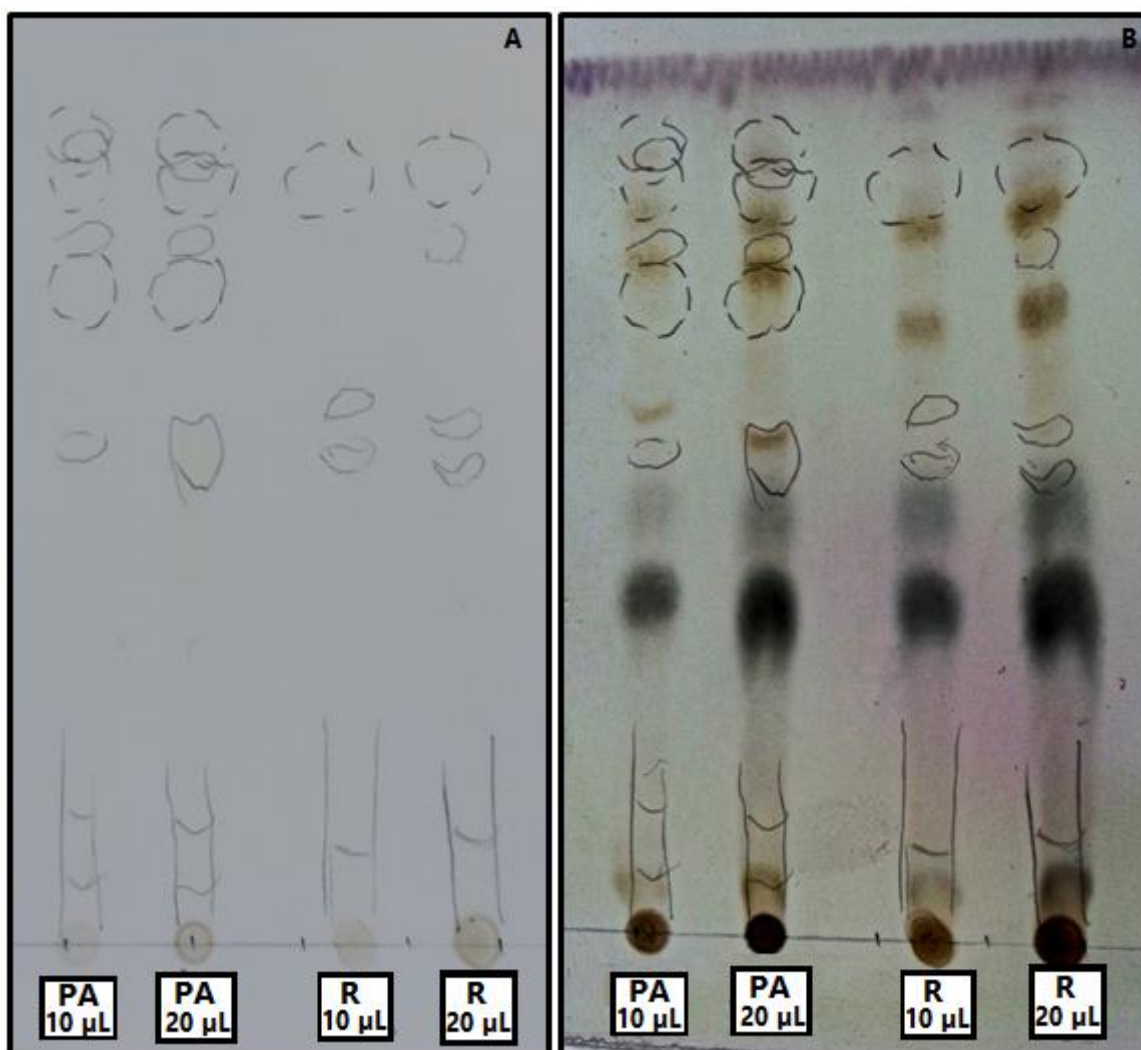


Figura 27. Visualização das placas de TLC, de fase reversa com indicador de fluorescência a 254 nm, após quatro aplicações (10 µL e 20 µL de PA1M e de R1M) e desenvolvimento com clorofórmio-metanol-água (64:50:10) como fase móvel. Observação realizada à luz visível, delineado a lápis nas zonas com fluorescência aos UV (a 254 nm e a 366 nm) antes da revelação (A), e depois da revelação com vanilina-ácido sulfúrico (B).

A figura 28 evidencia as diferenças marcadas entre a constituição química das partes da planta estudadas e o solo, o que está de acordo com as diferentes atividades verificadas entre a parte aérea e a raiz da planta, e o solo.

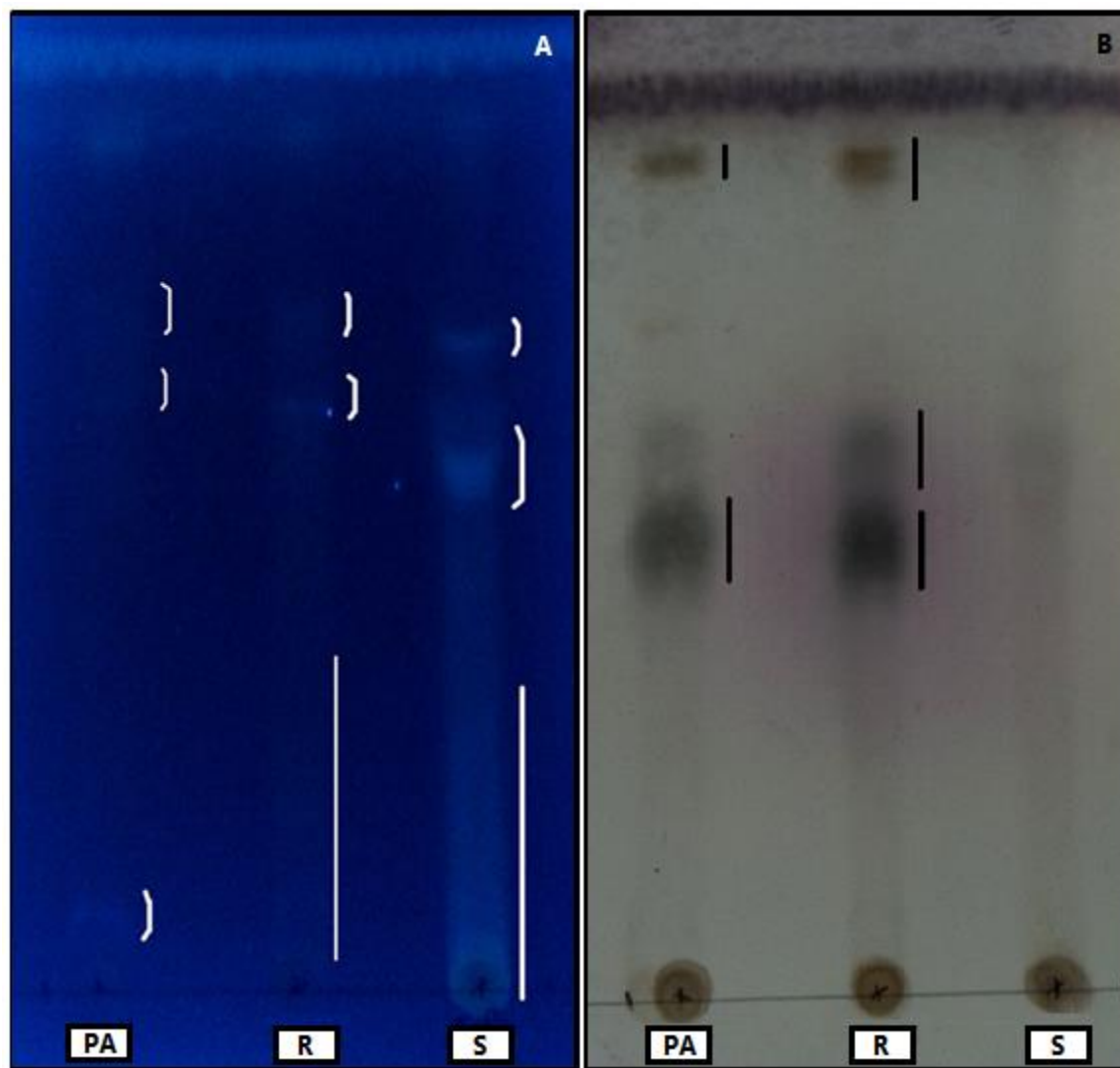


Figura 28. Visualização das placas de TLC, de fase reversa com indicador de fluorescência a 254 nm, após três aplicações (PA1M, R1M e S1M) e desenvolvimento com clorofórmio-metanol-água (64:50:10) como fase móvel. Observação realizada aos UV (a 366 nm) antes da revelação (A), e depois da revelação com vanilina-ácido sulfúrico (B), à luz visível.

IV. DISCUSSÃO

A avaliação sobre a capacidade dos extratos em induzir a eclosão, permitiu verificar que certos extratos tinham mais eficácia do que outros, dependendo da parte da planta e da sua idade. Segundo um estudo de Sasaki-Crawley (2013), os extratos aquosos e metanólicos da parte aérea de *S. sisymbriifolium* foram capazes de induzir forte eclosão de *G. pallida*. No entanto, neste trabalho isso não se verificou, tendo esse extrato provocado apenas 1% de eclosão. O mais eficaz foi o extrato de solo (com taxa de 17%), seguido do de raiz que também apresentou uma taxa de eclosão considerável (14%). Para *G. rostochiensis*, o único realmente eficaz foi o extrato de solo (69%). Apesar da taxa de eclosão ser muito superior para esta espécie, não significa necessariamente que o extrato de solo provoque mais eclosão de *G. rostochiensis* que de *G. pallida*. Ryan *et al.* (2000) observaram que na presença de batateiras, *G. pallida* eclodia com atraso relativamente a *G. rostochiensis*. Significativamente menos J2 de *G. pallida* eclodiram nas duas primeiras semanas, embora as diferenças tenham desaparecido após as quatro semanas. Como os ensaios deste trabalho decorreram durante quatro semanas, pareceu-nos provável que este tempo seria suficiente, mas não será de descartar a hipótese de repetir os ensaios aumentando a sua duração. Com este trabalho foi possível confirmar que *S. sisymbriifolium* é capaz de induzir a eclosão de *Globodera* spp., sabendo que este efeito indutor também foi observado em *Meloidogyne* spp. (Conceição *et al.*, 2012).

Entre as plantas com três idades diferentes, foi o extrato de solo correspondente às plantas com 2 meses de desenvolvimento que teve maior efeito na eclosão, 75% para *G. pallida* e 55% para *G. rostochiensis*, apesar de para esta última se ter verificado maior atividade para plantas com 1 mês.

Depois de fracionar os extratos de solo de plantas com um e dois meses (S1M e S2M) e de testar as frações, uma delas destacou-se no efeito que teve na eclosão, para cada espécie: a fração metanólica (FC), com taxa de 126,17% (sendo até mais eficaz que o exsudato de batateira) para *G. pallida*, e para *G. rostochiensis* a fração hidro-metanólica (fração C'), que provocou a maior eclosão (32,04%). Isto permitiu isolar o fator de eclosão, sendo agora necessário dar continuidade a este trabalho, quer subfracionando as frações e testando-as nos nemátodes, numa tentativa de isolar os compostos responsáveis por essa atividade; quer realizando estudos por vários processos cromatográficos para detectá-los e identificá-los.

Tem sido referida a existência de saponinas em várias Solanaceas: na batata, tomate, beringela e pimentos, tal como na erva-moura (*S. nigrum*), na doce-amarga (*S.*

dulcamara) e na jurubeba (*S. paniculatum*) (Price *et al.*, 1987). Elas exibem em geral um amplo espectro de efeitos farmacológicos e biológicos, podendo agir como fungicidas, moluscicidas, antibacterianas e antivirais (Sprag *et al.*, 2004). Saponinas isoladas das folhas da figueira-do-diabo (*S. chrysotrichum*) evidenciaram efeito antifúngico (Zamilpa *et al.*, 2002), uma saponina isolada dos frutos de *Capsicum frutescens* (pimenta) também revelou propriedades fungicidas (de Lucca *et al.*, 2002), e saponinas isoladas das sementes de *C. annuum* (pimentão) mostraram igualmente forte atividade antifúngica (Iorizzi *et al.*, 2002). Estas informações sugerem que as saponinas têm um interessante potencial biocida, que pode ser relacionado com as interações destrutivas que têm com os constituintes da membrana celular (esteróides, proteínas e fosfolípidos) (Tava & Avato, 2006). Curiosamente foi detetada a presença de saponinas também em *S. sisymbriifolium*, quer na raiz (Ferro *et al.*, 2005), quer na parte aérea, embora em pequena quantidade (Gupta *et al.*, 2014). Para avaliar a sua eventual contribuição para a atividade dos diversos extratos o estudo cromatográfico, foi direcionado para a deteção de saponinas, tendo sido possível constatar a presença de composições químicas significativamente diferentes, qualitativa e quantitativamente entre as partes vegetativas das plantas (parte aérea e raiz) e o solo. De facto, enquanto na planta foi nítida a presença de compostos de cor castanha amarelada e violeta escuro após revelação com vanilina-ácido sulfúrico, comum a saponósidos (Wagner *et al.*, 1984), nos extratos de solo essa evidência não foi tão marcada. Este resultado sugere que no solo a atividade não está relacionada com os compostos marcadamente detetados na planta, podendo tratar-se de outro tipo de compostos ou de saponósidos de natureza química diferente dos presentes na planta.

Sabendo que os fatores de eclosão dos exsudatos alteram a permeabilidade da membrana dos ovos (permitindo a rehidratação e eclosão dos J2) (Perry, 1989), é de questionar se as saponinas não terão um papel também neste processo visto que elas próprias têm capacidade de destruir membranas celulares e aumentar a permeabilidade iónica (Tava & Avato, 2006). Esta hipótese deverá ser considerada em estudos futuros.

No entanto, nenhum dos extratos teve efeito nematocida nas duas espécies de *Globodera*. Os resultados sugerem que não existe nenhum fitoquímico na planta que seja diretamente responsável pela morte dos J2. No entanto, as plantas podem libertar compostos tóxicos que interfiram nos processos de vida dos nemátodes (Gommers, 1981), tendo um efeito indireto na mortalidade que não foi testado neste trabalho. O efeito

nematodocida de *S. sisymbriifolium* pode estar relacionado com a paralisação dos J2, ou pelo impedimento do seu desenvolvimento e/ou diferenciação, por exemplo.

Raphanus sativus e *Sinapis alba*, que são plantas usadas na biofumigação de solos, têm capacidade de reduzir populações de *Heterodera schachtii* ao interromper a sua diferenciação sexual, resultando em números muito baixos de fêmeas na geração seguinte. Este mecanismo de resistência está relacionado com o aumento da razão macho-fêmea (Muller, 1985) e não à incapacidade dos juvenis em penetrar nas raízes (Caubel & Chaubet, 1985; Lelivelt & Hoogendoorn, 1993). É então possível que este tipo de defesa também seja utilizado por *S. sisymbriifolium*. De fato, Roberts e Stone (1983) ao analisarem a atividade de *Globodera* spp. nas raízes de *S. sisymbriifolium* observaram que os nemátodes invadiam a raiz e iniciavam a formação do sincício. No entanto, não havia desenvolvimento para além dos J3; não foram encontrados J4, quistos, fêmeas ou machos adultos nas raízes, nem no solo envolvente. Esta incompatibilidade entre *S. sisymbriifolium* e *Globodera* spp. é considerada rara pelo facto de existir algo a travar a diferenciação não só das fêmeas, mas também dos machos. Dias *et al.* (2012) relataram que em plantas inoculadas com *Meloidogyne* spp., ocorria a penetração de um número elevado de nemátodes, mas a maior parte não se desenvolvia para além do segundo estágio. Estes factos sugerem que a planta impossibilita o normal desenvolvimento dos nemátodes.

Num estudo mais recente, Sasaki-Crawley (2013) investigou esta imunidade, para perceber se havia compostos que matassem ou paralisassem os nemátodes. Foram expostos à raiz uma dúzia de J2 durante um certo tempo, e no final observaram-se pelo menos dois J2 que se moviam claramente, demonstrando segundo o autor que compostos nematodocidas e nematostáticos não estão presentes nas raízes. Giannakou, em 2011, demonstrou que *Quillaja saponaria* provocava a paralisação dos juvenis e a inibição da eclosão de *Meloidoyne incognita*. Neste trabalho, a maior parte dos J2 estavam vivos no final dos ensaios de mortalidade, mas foi notada uma falta de movimento que muitas vezes impedia a distinção entre os vivos e os mortos. Seria interessante no futuro repetir estes testes, e no final utilizar os J2 em testes de viabilidade para verificar se ainda eram capazes de invadir um hospedeiro depois de expostos aos extratos.

Apesar dos fatores de eclosão não serem nematodocidas diretos, podem ser usados em campo com esse objetivo se aplicados antes da plantação das batateiras. Seria extremamente útil a existência de um produto comercial com base nesta planta que atuasse no solo, sem haver a necessidade de integrar a *S. sisymbriifolium* na rotação de culturas. Este método teria as vantagens das culturas-armadilhas: eficácia em reduzir populações de

nemátodes (e talvez outras pestes), respeito pelo meio ambiente, boa solução económica – e eliminava a desvantagem da rotação, de alguns anos, de culturas imposta nesta forma de controlo. Além disso, não haveria a necessidade de introduzir uma planta que não existe na flora portuguesa e que se não forem tomadas as devidas precauções poderá tornar-se uma infestante difícil de combater. Este trabalho é uma contribuição para o conhecimento das propriedades biológicas e do potencial de *S. sisymbriifolium* como agente de combate aos nemátodes fitoparasitas em particular aos NQB.

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

A batata constitui uma das principais fontes de alimento do mundo. É a quarta principal cultura alimentar do mundo, depois do milho, arroz e trigo, com 376 milhões de toneladas produzidas em 2013. São cultivadas em mais de 150 países, principalmente na Ásia e Europa (FAO, 2013). Têm boas qualidades nutritivas e gustativas, e podem ser cultivadas em vários climas (Timmermans, 2005).

Em Portugal, a produção de batata tem vindo a subir desde 2010, sendo que em 2013 foram atingidas as 487 mil toneladas de batata (FAO, 2013). O rendimento médio da produção de batata de consumo é de cerca de 18 t/ ha, e na União Europeia o rendimento é quase o dobro (31 t/ ha) (Relatório da Comissão Europeia, Direção Geral da Saúde e dos Consumidores, 11/04/2014; FAO, 2013). As saídas económicas para essa cultura são grandes, no entanto a batata é atacada por muitas pragas e organismos patogénicos que causam perdas significativas, como os NQB que ocorrem em todas as principais áreas de produção de batata, com uma média nacional de 50% dos campos infestados e 100% em algumas áreas (Cunha *et al.*, 2012).

A propagação de nemátodes é dos problemas mais graves no plantio mundial de batatas e outras Solanaceas (Hayock & Evans, 1998), sendo uma das pragas mais difíceis de controlar (Chitwood, 2002). A sua distribuição ampla, a extensa gama de hospedeiros e o envolvimento com outros microorganismos coloca os nemátodes no topo da lista das pragas de plantas que afetam a produção agrícola (Jatala & Bridge, 1990). *Globodera* spp. representa um sério problema na produção mundial de batata (Turner & Evans, 1998), e estima-se que os NQB sejam responsáveis por cerca de 12,2% das perdas anuais na produtividade mundial da cultura da batata (Urwin *et al.*, 2001). As perdas podem chegar a 25% ou mais, e estas perdas devem-se ao dano causado na planta e na redução da qualidade do tubérculo (Youssef, 2012). Os nemátodes reconhecidos como principais parasitas da batata são *Globodera* spp., *Meloidogyne* spp., *Ditylenchus* spp. e *Pratylenchus* spp. No entanto, muitas outras espécies estão associadas à batata como *Belonolaimus*, *Longidorus*, *Xiphinema*, *Rotylenchulus* spp. e *Radopholus similis*, sendo a maioria destes de menor importância (Jatala & Bridge, 1990).

São praticados atualmente diferentes métodos de controlo mas as desvantagens destes métodos, quer económicas, quer ambientais, vão além do implemento destas estratégias. A conseqüente retirada da maioria dos nematodocidas químicos disponíveis

[Directiva (91/414/CEE), Regulamento (CE) N° 1107/2009 e Directiva (2009/128/CE)] tem profundamente limitado o uso de pesticidas em culturas agrícolas, gerando um interesse crescente em ferramentas alternativas de controlo de pragas (Avato *et al.*, 2013). Está a aumentar a necessidade de descobrir produtos menos tóxicos, mais eficazes e economicamente convenientes, criando importantes oportunidades para a investigação de soluções alternativas, como compostos naturais com efeitos nematodocidas (Ntalli & Caboni, 2012).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o potencial de *S. sisymbriifolium* como agente de controlo, ao possuir compostos indutores de eclosão dos NQB e apresentando várias vantagens, tornando-se evidente a importância de continuar esta pesquisa. Mais trabalho se perspectiva a ser realizado a nível da análise fitoquímica do solo, a fim de determinar qual(ais) os compostos que mais contribuem para a marcada atividade registada com o extrato do solo, assim como aquilatar sobre uma eventual diferença de composição qualitativa e/ou quantitativa do solo em plantas de um e de dois meses. Os testes de eclosão devem ser repetidos e explorados, assim como outros testes devem ser integrados. Uma vez identificados os agentes de eclosão será possível integrar a sua utilização na prática agrícola.

VI. BIBLIOGRAFIA

Akhtar, M. (2000). Nematicidal potential of the neem tree *Azadirachta indica* (A. Juss). *Integrated Pest Management Reviews*, 5: 57-66.

Akhtar, M. & Malik, A. (2000). Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology*, 74: 35-47.

Alconero, R.; Robinson R.W.; Dicklow B. & Sail J. (1988). *Verticilium wilt* in eggplant, related *Solanum* species, and interspecific hybrids. *Horticultural Science*, 23 (2): 388-90.

Ali, M.; Quadir, M.A.; Okubo, H. & Fujieda, K. (1990). Resistance of eggplant, its wild relatives and their hybrids to different strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Scientia Horticulturae*, 45 (1): 1-9.

Apu, A.S.; Bhuyan, S.H.; Matin, M.; Hossain, F.; Khatun, F. & Taiab, A. (2013). Analgesic, neuropharmacological, anti-diarrheal, and cytotoxic activities of the extract of *Solanum sisymbriifolium* (Lam.) leaves. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 3(4): 302.

Arbeli, Z. & Fuentes, C.L. (2007). Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection*, 26: 1733-1746.

Avato, P.; D'Addabbo, T.; Leonetti, P. & Argentieri, M.P. (2013). Nematicidal potential of Brassicaceae. *Phytochemistry Reviews*, 12 (4): 791-802.

Babalola, J.O. (1982). Effects of soil amendments in tomato cultivation. In: Proceedings 5th Annual Conference Horticultural Society of Nigeria, Ahmadu Bello University, Zaria.

Badenes-Perez, F.R.; Shelton, A.M. & Nault, B.A. (2005). Using yellow rocket as a trap crop for diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology* 98: 884-890.

Baldwin, J.G. & Mundo-Ocampo, M. (1991). Heteroderinae, cyst- and non- cyst- forming nematodes. In: Nickle WR, ed. *Manual of Agricultural Nematode*. New York: Marcel Dekker Inc, 275-362 pp.

Barbosa, P.; Lima, A.S.; Vieira, P.; Dias, L.S.; Tinoco, M.T. & Barroso, J.G. (2010). Nematicidal activity of EOs and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Nematology*, 42: 8-16.

Bardgett, R.D.; Cook, R.; Yeates, G.W. & Denton, C.S. (1999). The influence of nematodes on below-ground processes in grassland ecosystems. *Plant and Soil*, 212 (1): 23-33.

Batish, D.R.; Singh, H.P.; Kohli, R.K. & Kaur, S. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256: 2166-74.

Beaulieu, C. Société de protection des plantes du Québec Québec Society for the Protection of Plants.

Bhuyan, M. & Hossan, S. (2012). Studies of the effects of *Solanum sismbriifolium* leaf on brine shrimp and different animal models (Doctoral dissertation), East West University.

Birch, A.N.E; Robertson, W. M.; Geoghegan, I.E.; McGavin, W.J.; Alphey, T.J.W.; Phillips, M.S.; Fellows, L.E.; Watson, A.A.; Simmonds, M.S.J & Porter, E.A. (1993). DMDP - a plant-derived sugar analogue with systemic activity against plant parasitic nematodes. *Nematologica*, 39: 521-535.

Bird, C. (2014). *The Fundamentals of Horticulture: Theory and Practice*. Cambridge University Press.

Blaxter, M.L.; De Ley, P.; Garey, J.R.; Liu, L.X.; Scheldeman, P.; Vierstraete, A.; Vanfleteren J.R.; Mackey LY.; Dorris M.; Frisse L.M., Vida J.T. & Thomas, W.K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392 (6671): 71-75.

Blok, W.J.; Lamers, J.G.; Termorshuizen, A.J. & Bollen, G.J. (2000). Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathology*, 90: 253-259.

Bones, A.M. & Rossiter, J.T. (2006). The enzymatically and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry*, 67: 1053–1067.

Bongers, T. (1988). The nematodes of the Netherlands. De nematoden van Nederland. Een identificatietabel voor de in Nederland aangetroffen Zoetwater-en bodembewunende nematoden.

Brodnitz, M.H.; Pascale, J.V. & Van Derslice, L. (1971). Flavor components of garlic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19 (2): 273-275.

Brown, E.B. (1969). Assessment of the damage caused to potatoes by potato cyst-eelworm, *Heterodera rostochiensis* Woll.. *Annals of Applied Biology*, 63: 493-495.

Bullock, D.G. (1992). Crop rotation. *Critical reviews in plant sciences*, 11 (4): 309-326.

Buskov, S.; Serra, B.; Rosa, E.; Sørensen H. & Sørensen J.C. (2002). Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* Woll). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 690-5.

Byrne, J.; Twomey, U.; Maher, N.; Devine, K.J. & Jones, P.W. (1998). Detection of hatching inhibitors and hatching stimulants for golden potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, in potato root leachate. *Annals of Applied Biology*, 132: 463-472.

Caubel, G. & Chaubet, B. (1985). Hatching and multiplication of *Heterodera schachtii* Schmidt in the presence of rapeseed and forage radish. Ecllosion et multiplication de *Heterodera schachtii* Schmidt en présence de colza ou de radis fourragers. *Agronomie*, 5: 463-466.

CABI/EPPO (No date) Data Sheets on Quarantine Pests *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. Prepared by CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003. 6 pp.

CABI, 2013. *Globodera rostochiensis*. Crop Protection Compendium. Accessed September 25, 2013 from: www.cabi.org/cpc.

CSL, Central Science Laboratory. 2003. Potato cyst nematodes. Ref n°. QIC/65. Department for Environmental Food and Rural Affairs, 2 pp.

Chakravarty A.K.; Mukhopadhyay, S.; Saha, S & Pakrashi, S.C. (1996). A neolignan and sterols in fruits of *Solanum sisymbriifolium*. *Phytochemistry*, 41: 935-939.

Chauhan, K.; Sheth, N.; Ranpariya, V. & Parmar, S. (2011). Anticonvulsant activity of solasodine isolated from *Solanum sisymbriifolium* fruits in rodents. *Pharmaceutical biology*, 49 (2): 194-199.

Chindo, P.S.; Khan, F.A. & Erinle, I.D. (1991). Reaction of the three tomato cultivars to two vascular diseases in the presence of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* race 1. *Crop Protection*, 10: 62-64.

Chitwood, D.J. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 221-249.

Chitwood, D.J. (2003). Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture- Agricultural Research Service. *Pest Management Science*, 59: 748-53.

Conceição, I.C.; Caetano, A.M.D.; Abrantes, I. & Cunha, M.J.M. (2012). Efeito dos exsudatos radiculares de *Solanum sisymbriifolium* na eclosão de *Meloidogyne* spp. *Revista de Ciências Agrárias*, 35 (2): 274-81.

Costa, S.S.R.; Santos, M.S.N.A. & Ryan, M.F. (2003). Effect of *Artemisia vulgaris* rhizome extracts on hatching, mortality and plant infectivity of *Meloidogyne megadora*. *Journal of Nematology*, 35: 435-442.

Cronin, D.; Moenne-Loccoz, Y; Fenton, A.; Dunne, C.; Dowling, D.N. & O'gara, F. (1997). Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonad strain f113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (4): 1357-1361.

Cunha, M.J.M.; da Conceição, I.L.P.M.; Abrantes, I.M.O. & Santos, M.S.N.A. (2012). Virulence assessment of Portuguese isolates of potato cyst nematodes (*Globodera* spp.). *Phytopathologia Mediterranea*, [S.l.]: 51-68.

D'Addabbo, T.; Avato, P. & Tava, A. (2009). Nematicidal potential of materials from *Medicago* spp. *European Journal of Plant Pathology*, 125: 39-49.

D'Addabbo, T.; Carbonara, T.; Leonetti, P.; Radicci, V.; Tava, A. & Avato, P. (2011). Control of plant parasitic nematodes with active saponins and biomass from *Medicago sativa*. *Phytochemical Reviews*, 10: 503-19.

D'Addabbo, T.; Carbonara, T.; Argentieri, M.P.; Radicci, V.; Leonetti, P.; Villanova, L. & Avato, P. (2013). Nematicidal potential of *Artemisia annua* and its main metabolites. *European Journal of Plant Pathology*, 137: 295.

Davey, C.B. (1996). Nursery soil management – organic amendments. In: Landis, T. D., Douth, D. B. (Eds), National proceedings, Forest and Conservation Nursery Associations. General Technical Report PNW-GTR-389: USDA Forest Service PNWRS, 6-18 pp.

De Bertoldi, M. (2008). Production and utilization of suppressive composts: environmental, food and health benefit. In: Insam H., Franke-Whittle & Goberna M. (Eds). *Microbes At Work from Wastes to Resource*, 153-170 pp.

De Lucca, A.; Bland, J.M.; Vigo, C.B.; Cushion, M.; Selitrennikoff, C.P.; Peter, J. & Walsh, T.J. (2002). CAY-1, a fungicidal saponin from *Capsicum* spp. fruit. *Medical Mycology*, 40 (2): 131-7.

De Waele, D.E. & Elsen, A. (2007). Challenges in Tropical Plant Nematology. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 457-485.

Devine, K.J.; Byrne, J.; Maher, N. & Jones, P.W. (1996). Resolution of natural hatching factors for golden potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*. *Annals of Applied Biology*, 129: 323-334.

Devine, K.J. & Jones, P.W. (2000). Purification and partial characterisation of hatching factors for the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* from potato root leachate. *Nematology*, 2: 231-236.

Dias, M.C.; Conceição, I.L.; Abrantes, I. & Cunha, M.J. (2012). *Solanum sisymbriifolium* - a new approach for the management of plant-parasitic nematodes. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 171-179.

Diretiva 91/414/CEE do Conselho de 15 de Julho de 1991, relativa à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. Jornal Oficial da União Europeia L 230. União Europeia, Bruxelas.

Diretiva 2009/128/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 21 de Outubro de 2009, que estabelece um quadro de acção a nível comunitário para uma utilização sustentável dos pesticidas. Jornal Oficial da União Europeia L 309. União Europeia, Bruxelas.

DSQP, Data Sheets on Quarantine Pests. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Retrieved on 2008-11-12.

El Allagui, N.; Tahrouch, S.; Bourijate, M. & Hatimi, A. (2007). Action of plant extracts on root-knot nematodes (*Meloidogyne* ssp.) mortality. *Acta Botanica Gallica*, 154: 503-9.

El-Din, H.K.M.; Allam, A. & Tag, B.A (2012). Nematicidal activity of some biopesticide agents and microorganisms against root-knot nematode on tomato plants under greenhouse conditions. *Journal of Plant Protection Research*, 52: 47-52.

Ellenby, C. & Gilbert, A.B. (1958). Influence of certain inorganic ions on the hatching of the potato root eelworm, *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. *Nature*, 182: 925-926.

Elmore, C.L.; Stapleton, J.J.; Bell, C.E. & Devay, J.E. (1997). Soil solarization, a nonpesticidal method for controlling diseases, nematodes, and weeds. University of California, Vegetable Research and Information Center.

Esteves, I.; Maleita C. & Abrantes, I. (2015). Root-lesion and root-knot nematodes parasitizing potato. *European Journal of Plant Pathology*, 141: 397-406.

Evans, K. (1970). Longevity of males and fertilization of females of *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica*, 16: 369-374.

Evans, K. & Brodie, B. B. (1980). The origin and distribution of the golden nematode and its potential in the USA. *American Potato Journal*, 57 (3): 79-89.

Evans, W.C. & Somanabandhu, A. (1980). Nitrogen-containing non-steroidal secondary metabolites of *Solanum*, *Cyphomandra*, *Lycianthes* and *Margaranthus*. *Phytochemistry*, 19 (11): 2351-2356.

Evans, K. & Stone, A.R. (1977). A review of the distribution and biology of the potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Pest Articles and News Summaries*, 23 (2): 178-189.

FAO, 2013 (Food Agriculture Organization) in <http://faostat.fao.org>, accessed on 23/06/15.

Fenwick, D.W. (1940). Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. *Journal of Helminthology*, 18: 155-72.

Fenwick, D.W. & Reid, E. (1953). Seasonal fluctuations in the degree of hatching from cysts of the potato root eelworm. *Nature*, 171: 47.

Ferro, E.A.; Alvarenga, N.L.; Ibarrola, D.A.; Helli6n-Ibarrola, M.C. & Ravelo, A. G. (2005). A new steroidal saponin from *Solanum sisymbriifolium* roots. *Fitoterapia*, 76 (6): 577-579.

Forrest, J.M.S. & Farrer, L.A. (1983). The response of eggs of the white potato cyst nematode *Globodera pallida* to diffusate from potato and mustard roots. *Annals of Applied Biology*, 103: 283-289.

Franco, J. (1979). Effect of temperature on hatching and multiplication of potato cyst-nematodes. *Nematologica*, 25 (2): 237-244.

Gamliel, A. & Stapleton, J.J. (1993a). Effect of chicken compost or ammonium phosphate and solarization on pathogen control, rhizosphere microorganisms, and lettuce growth. *Plant Disease*, 77: 886-891.

Gamliel, A. & Stapleton, J.J. (1993b). Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. *Phytopathology*, 83: 899-905.

Giannakou, I.O. (2011). Efficacy of a formulated product containing *Quillaja saponaria* plant extracts for the control of root-knot nematodes. *European Journal of Plant Pathology*, 130: 587-96.

Grainger, J. (1964). Factors affecting the control of eelworm diseases. *Nematologica* 10: 5-20.

Golinowski, W.; Sobczak, M.; Kurek, W. & Grymaszewska (1997). The structure of Syncytia. In: Fenoll C, Grundler F.M.W., Ohl S.A., eds. Cellular and Molecular Aspects of Plant Nematode Interactions. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 80-97 pp.

Gomero, O.L. (no date). Plantas para proteger cultivos. Lima : red de acción en alternativas al uso de agroquímicos, 239 pp.

Gommers, F.J. (1981). Biochemical interactions between nematodes and plants and their relevance to control. *Helminthology Abstract*, 50: 9-24.

Gonzalez, J.A.; Estevez-Braun, A.; Estevez-Reyes, R. & Ravelo, A.G. (1994). Inhibition of potato cyst nematode hatch by lignans from *Bupleurum salicifoliuni* (Umbelliferae). *Journal of Chemical Ecology*, 20 (3): 517-524.

Grundy, P.R.; Sequeira, R.V. & Short, K.S. (2004). Evaluating legume species as alternative trap crops to chickpea for management of *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) in central Queensland cotton cropping systems. *Bulletin of Entomological Research*, 94 (6): 481-486.

Gupta, V.K.; Simlai, A.; Tiwari, M.; Bhattacharya, K. & Roy, A. (2014). Phytochemical contents, antimicrobial and antioxidative activities of *Solanum sisymbriifolium*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4 (3): 75-80.

Hay, R.K.M & Porter, J.R. (2006). Limiting factors and the achievement of high yield. In the physiology of crop yield, 2nd Edition, 180-202 pp. Eds R Hay and J Porter. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.

Haydock, P.P.J. & Evans, K. (1998). Management of potato cyst nematodes in the UK: an integrated approach? *Outlook on Agriculture*, 27 (4): 253-260.

Hominick, W.M. (1986). Photoperiod and diapause in the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Nematologica*, 32: 408-418.

Hooker, W.J. (1981). Compendium of Potato Diseases, American Phytopathological Society, Potato Association of America, 125 pp.

Hill, M.P. & Hulley, P.E. (1995). Biology and host range of *Gratiana spadicea* (Klug, 1829) (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae), a potential biological control agent for the weed *Solanum sisymbriifolium* Lamarck (Solanaceae) in South Africa. *Biological Control*, 5 (3): 345-352.

Hill, M.P. & Hulley, P.E. (2000). Aspects of the phenology and ecology of the South American weed, *Solanum sisymbriifolium*, in the Eastern Cape Province of South Africa. *African Plant Protection*, 6: 53-59.

Hugot, P.; Aujard, P. & Moran S. (2001). Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, 3 (3): 199-208.

Hynes, R.K & Boyetchko, S.M. (2006). Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 845-849.

Ibarrola, D.A.; Helli6n-Ibarrola, M.C.; Montalbetti, Y.; Heinichen, O.; Campuzano, M.A.; Kennedy, M.L.; Alvarenga, N.; Ferro, E.A.; D6lz-Vargas, J.H. & Momose, Y. (2011). Antihypertensive effect of nuatigenin-3-Ochacotriose from *Solanum sisymbriifolium* Lam. (Solanaceae) in experimentally hypertensive (ARH + DOCA) rats under chronic administration. *Phytomedicine*, 18: 634-40.

Iorizzi, M.; Lanzotti, V.; Ranalli, G.; De Marino, S. & Zollo, F. (2002). Antimicrobial furostanol saponins from the seeds of *Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (15): 4310-6.

Jatala, P. & Bridge, J. (1990). Nematode parasites of root and tuber crops. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture, 2ed, CABI publishing, 137-80 pp.

Jatala, P.; Kaltenbach, R. & Bocangel, M. (1979). Biological control of *Meloidogyne incognita acrita* and *Globodera pallida* on potatoes. *Journal of Nematology*, 11: 303.

Javed, N.; Gowen, S.R.; Inam-ul-Haq, M.; Abdullah, K. & Shahina, F. (2007). Systemic and persistent effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations against root-knot nematodes, *Meloidogyne javanica* and their storage life. *Crop Protection*, 26: 911-916.

Johnson, I. & Williamson, G. (2003). Phytochemical functional foods, CRC. Press.

Jones, F.G.W. (1969). Some reflections on quarantine, distribution and control of plant nematodes. Commonwealth Bureau of Helminthology Technical Communication, 40: 67-80.

Jones, F.G.W. (1970). The control of the potato cyst-nematode. *Journal of the Royal Society of Arts*, 118: 179-199.

Jones, P.W.; Tylka, G.L. & Perry, R. (1998). In: Perry, R.N. & D.J. Wright (Eds) *The Physiology and Biochemistry of Free-living and Plant-parasitic Nematodes*. London. CABI Publishing. 181-212 pp.

Jones, P.W. (1981). Host cell responses to endoparasitic nematode attack: structure and functioning of giant cells and syncytia. *Annals of Applied Biology*, 97: 353-394.

Karpouzias, D. G.; Karanasios, E. & Menkissoglu-Spiroudi, U. (2004). Enhanced microbial degradation of cadusafos in soils from potato monoculture: demonstration and characterization. *Chemosphere*, 56: 549-559.

Katan, J. (1981). Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. *Annual Review of Phytopathology*, 19 (1): 211-236.

Khan, A; Williams, K.L. & Nevalainen, H.K.M. (2004). Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. *Biological Control*, 31: 346-352.

Khan, A.; Williams, K. L. & Nevalainen, H.K.M. (2006). Control of plant-parasitic

nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum* in pot trials. *Biocontrol*, 51 (5): 643-658.

Kim, J.; Seo, S.M.; Lee, S.G.; Shin, S.C. & Park, I.K. (2008). Nematicidal activity of plant essential oils and components from coriander (*Coriandrum sativum*), Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) and valerian (*Valeriana wallichii*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56: 7316-7320.

Korolkovas, A. (1988). Development of Drugs. Essentials of Medicinal Chemistry, Second Edition, John Wiley and Sons, 97-118 pp.

Lainsbury, M. A. (2014). British Crop Production Council. The UK Pesticide Guide. Wallingford, Oxon: CABI.

Lamshead, P.J.D. (1993). Recent developments in marine benthic biodiversity research. *Oceanis*, 19: 5-24.

Lamberti, F. & Taylor, C.E. (1986). Cyst nematodes. Nato ASI Series, 121: 4.

LaMondia, J.A. & Brodie, B.B. (1984). Control of *Globodera rostochiensis* by solar heat. *Plant Disease*, 68 (6): 474-476.

Lawless, H.; Rozin, P. & Shenker, J. (1985). Effects of oral capsaicin on gustatory, olfactory and irritant sensations and flavor identification in humans who regularly or rarely consume chili pepper. *Chemical Senses*, 10 (4): 579-589.

Leela, N.K.; Khan, R.M.; Reddy, P.P. & Nidiry, E.S.J. (1992). Nematicidal activity of essential oil of *Pelargonium graveolens* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterranea*, 20: 57-8.

Lelivelt, C.L.C & Hoogendoorn, J. (1993). The development of juveniles of *Heterodera schachtii* in roots of resistant and susceptible genotypes of *Sinapsis alba*, *Brassica napus*, *Raphanus sativus* and hybrids. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 99: 13-22.

Macara, A.M. (1963). Contribuição para o estudo morfológico e biológico dos nemátodes *Heterodera goettingiana* Liebscher, 1892 e *rostochiensis* Wollenweber, 1923 encontrados em Portugal. *Broteria*, 32-25 pp.

Maistrello, L.; Vaccari, G.; Sasanelli, N. (2010). Effect of chestnut tannins on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Helminthologia*, 47 (1): 48-57.

Maga, J.A. (1980). Potato glycoalkaloids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 12 (4): 371-405.

Mamone, L.; Di Venosa, G.; Valla, J.J.; Rodriguez, L.; Gándara, L.; Batlle, A.; Heinrich, M.; Juarranz, A.; Sanz-Rodriguez, F. & Casas, A. (2010). Cytotoxic effects of Argentinean plant extracts on tumour and normal cell lines. *Cellular and molecular biology* (Noisy-le-Grand, France), 57: 1487-99.

Matthiessen, J.N. & Kirkegaard, J.A. (2006). Biofumigation and enhanced biodegradation: opportunity and challenge in soilborne pest and disease management. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25: 235-265.

Mazumdar, B.C. (1984). Steroidal sapogenins in two wild species of *Solanum*. *Science and Culture*, 50: 122-123.

Meher, H.C.; Gajbhiye, V.T.; Chawla, G. & Singh, G. (2009). Virulence development and genetic polymorphism in *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood after prolonged exposure to sublethal concentrations of nematicides and continuous growing of resistant tomato cultivars. *Pest Management Science*, 65: 1201-1207.

Moxnes, J.F. & Hausken, K. (2007). The population dynamics of potato cyst nematodes.

Ecological Modelling, 207: 339-348.

Mulder, A. (1994). Tolerance of the potato to stress associated with potato cyst nematodes, drought and pH. An ecophysiological approach. (PhD Thesis) Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 190 pp.

Mulder, J.G.; Diepenhorst, P.; Plieger, P. & Brüggemann-Rotgans, I.E.M. (1996). Hatching agent for the potato cyst nematode. PCT/NL92/00126. United States Patent, Patent Number 5, 585, 505, 1 pp.

Muller, J. (1985). The influence of the host plant on the sex determination in *Heterodera schachtii*. Der einfluss der wirtspflanze auf die geschlechtsdeterminierung bei *Heterodera schachtii*. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* 226: 46-63.

Muller, J. (1999). The economic importance of *Heterodera schachtii* in Europe. *Helminthologia*, 36: 205-213

Ngala, B.M.; Haydock, P.P.J; Woods, S. & Back, MA. (2014). Biofumigation with *Brassica juncea*, *Raphanus sativus* and *Eruca sativa* for the management of field populations of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Pest Management Science*.

Ntalli, N.G.; Ferrari, F.; Giannakou, I. & Menkissoglu-Spiroudi U. (2010). Phytochemistry and nematicidal activity of the essential oils from 8 Greek Lamiaceae aromatic plants and 13 terpene components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 7856-7863.

Ntalli, N.G. & Caboni, P. (2012). Botanical Nematicides: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 9929-9940.

Odeyemi, I.S. & Adewale, K.A. (2011). Phytonematotoxic properties and nematicidal potential of *Tithonia diversifolia* extract and residue on *Meloidogyne incognita* infecting yam (*Discoria rotundata*). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44: 1745-53.

Oka, Y.; Nacar, S.; Putievsky, E.; Ravid, U.; Yaniv, Z. & Spiegel, Y. (2000). Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology*, 90: 710-715.

Oka, Y.; Tkachi, N.; Shuker, S. & Yerumiyahu, U. (2007). Enhanced nematicidal activity of organic and inorganic ammonia-releasing amendments by *Azadirachta indica* extracts. *Journal of Nematology*, 39 (1): 9-16.

Oliveira, R.D.L.; Dhingra, O.D.; Lima, A.O.; Jham, G.N.; Berhow, M.A.; Holloway, R.K. & Vaughn, S.F. (2011). Glucosinolate content and nematicidal activity of Brazilian wild mustard tissues against *Meloidogyne incognita* in tomato. *Plant Soil*, 341: 155-64.

Olthof, T.H. & Estey, R.H. (1963). A nematotoxin produced by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* Fresenius. *Nature*, 197: 514-515.

Paranjape, K.; Gowariker, V.; Krishnamurthy, V. N. & Gowariker, S. (2014). The Pesticide Encyclopedia. CABI.

PCN Control Group, 2004. SA-LINK 112 Projects: Introducing *Solanum sisymbriifolium* as a trap crop for potato cyst nematodes in the UK. Nematode Interaction Unit at Rothamsted Research.

Pérez, M.P.; Navas-Cortés, J.A.; Pascual-Villalobos, M.J. & Castillo, P. (2003). Nematicidal activity of essential oils and organic amendments from Asteraceae against root-knot nematodes. *Plant Pathology*, 52: 395-401.

Perry, R.N. (1989). Dormancy and hatching of nematode eggs. *Parasitology Today*, 5: 377-388 pp.

Price, K.R.; Johnson, I.T. & Fenwick, G.R. (1987). The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. C.R.C. *Critical Reviews in Food*

Science and Nutrition, 26 (1): 27-135.

Qui, S. J.; Can, J. Y.; Liu, W. P. & Becker, J. O. (2004). Degradation and absorption of fosthiazate in soil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52: 6239-6242.

Ravichandra, N.G. (2014). Horticultural Nematology. *Springer*, 3: 25.

Ratnadass, A.; Fernandes, P.; Avelino, J. & Habib, R. (2012). Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: a review. *Agronomy for sustainable development*, 32 (1): 273-303.

Regulamento (CE) N.º 1107/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 21 de Outubro de 2009, relativo à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. Jornal Oficial da União Europeia L 309/1. União Europeia, Bruxelas.

Renčo, M.; Sasanelli, N. & Kováčik, P. (2011). The effect of soil compost treatments on potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *Helminthologia*, 48 (3): 184-194.

Renčo, M., Sasanelli, N., Papajová, I., & Maistrello, L. (2012). Nematicidal effect of chestnut tannin solutions on the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* (Woll.) Barhens. *Helminthologia*, 49 (2): 108-114.

Roberts, P.A. & Stone, A.R. (1983). Comparisons of invasion and development of *Globodera* spp. and european potato cyst-nematode pathotypes in roots of resistant *Solanum* sg. *Leptostemonum* spp.. *Nematologica*, 29 (1): 95-108.

Robinson, M.P.; Atkinson, H.J. & Perry, R.N. (1987). The influence of soil moisture and storage time on the motility, infectivity and lipid utilization of second stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Revue de Nematologie*, 10: 343-348.

Ryan, N.A.; Duffy, E.M.; Cassells, A.C. & Jones, P. W. (2000). The effect of mycorrhizal fungi on the hatch of potato cyst nematodes. *Applied Soil Ecology*, 15 (2): 233-240.

Sangwan, N.K.; Verma, B.S.; Verma, K.K. & Dhindsa, K.S. (1990). Nematicidal activity of some essential plant oils. *Pesticide Science*, 28: 331-335.

Santos, M.D.A. & Fernandes, M.F.M. (1988). The occurrence of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* in Portugal. *Nematologia mediterranea*, 16 (1).

Sarwar, M. & Kirkegaard, J.A. (1998). Biofumigation potential of brassicas II: Effect of environment and ontogeny on glucosinolate production and implications for screening. *Plant and Soil*, 201: 91-101.

Sasaki-Crawley, A. (2013). Signalling and behaviour of *Globodera pallida* in the rhizosphere of the trap crop *Solanum sisymbriifolium*. (Master Dissertation) Plymouth University.

Sasser, J. (1987). A perspective on nematode problems worldwide. Proceedings Nematodes Parasitic to Cereals and Legumes in Temperature Semiarid Regions, Larnaca, Cyprus. ICARDA, Aleppo, Syria, 1-12 pp.

Sasser, J.N. & Freckman, D.W. (1987). A world perspective on nematology: the role of the society, in Vistas on nematology, Veech J.A. and Dickson D.W., Society of Nematologists, Hyattsville, Maryland, 7–14 pp.

Saxena, G. & Mittal, N. (1995). Trap formation by conidia of nematode-trapping fungus *Monacrosporium* spp.. *Mycological Research*, 99: 839-840.

Saxena, M.C.; Sikora, R.A. & Srivastava, J.R. (1988). Nematodes parasitic to cereals and legumes in temperate and semi-arid regions, 69-84 pp. Aleppo, Syrian Arab Republic, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas.

Sayre, R.M.; Wergin, W.P.; Schmidt, J.M. & Starr, M.P. (1991). *Pasteuria nishizawae* sp. nov., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic on cyst nematodes of genera *Heterodera* and *Globodera*. *Research in Microbiology*, 5: 551-64.

Schlathoelter, N.A. (2004). Biofumigation with nematode resistant crops. *Agroindustria*, 3: 407.

Schluter, K. (1976). The potato cyst eelworm *Heterodera rostochiensis* Woll. in Morocco: its distribution and economic importance. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 83: 401-406.

Scholte, K. (2000a). Effect of potato used as trap crop on potato cyst nematodes and other soil pathogens and on the growth of a subsequent main potato crop. *Annals of Applied Biology*, 136: 229-238.

Scholte, K. (2000b). Screening of nontuber bearing Solanaceae for resistance and induction of juvenile hatch of potato cyst nematodes and their potential for trap cropping. *Annals of Applied Biology*, 136: 239-246.

Scholte, K. (2000c). Growth and development of plants with potential for use as trap crops for potato cyst nematodes and their effects on the number of juveniles in cysts. *Annals of Applied Biology*, 137: 31-42.

Scholte, K. & Vos, J. (2000). Effects of potential trap crops and planting date on soil infestation with potato cyst nematodes and root-knot nematodes. *Annals of Applied Biology*, 137: 153-164.

Schomaker, C.H. & Been, T.H. (1999). A model for infestation foci of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Phytopathology*, 89 (7): 583-590.

Shelton, A.M. & Badenes-Perez, F.R. (2006). Concepts and applications of trap cropping in pest management. *The Annual Review of Entomology*, 51: 285-308.

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

Shilpi, J.A.; Rouf, R.; Sarker, M.A.M.; Qamrunnahar; Ferdous, M.M. & Uddin, S.J. (2005). Antinociceptive activity of methanol extract of *Solanum sisymbriifolium* Lamk. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8: 1123-1125.

Siddiqui, I.A. & Shaukat, S.S. (2004). *Trichoderma harzianum* enhances the production of nematicidal compounds in vitro and improves biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas fluorescens* in tomato. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 169-175.

Silva, T.M.S.; Batista, M.M.; Camara, C.A. & Agra, M.F. (2005). Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum* spp. (Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 99 (4): 419-425.

Smith, L.B. & Downs, R.J. (1966). Flora ilustrada catarinense: Solanáceas. Itajaí : Herbário Barbosa Rodrigues, 321 pp.

Sprag, S.G.; Light, M.E. & Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94: 219-243.

Stintzing, F.C.; Stintzing, A.S.; Carle, R.; Frei, B. & Wrolstad, R.E. (2002). Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (21): 6172-6181.

Stirling, G.R.; Nicol, J.M. & Reay, F. (1998). Advisory services for nematode pests – operational guide (Rural Industries Research and Development Corporation Publication No. 99/41, 120 pp.), Canberra.

Sultana, N.; Akhter, M.; Khan, R.A.; Afza, N.; Tareen, R.B. & Malik, A. (2010). Nematicidal natural products from the aerial parts of *Buddleja crispa*. *Natural Product Research*, 24: 783-788.

Szallasi, A. (2005). Piperine: researchers discover new flavor in an ancient spice. *Trends in pharmacological sciences*, 26 (9): 437-439.

Takasugi, M.; Yachida, Y.; Anetai, M.; Masamune, T. & Kagasawa, K. (1975). Identification of asparagusic acid as a nematicide occurring naturally in the roots of asparagus. *Chemistry Letters*, 4546 pp.

Tava, A. & Avato, P. (2006). Chemical and biological activity of triterpene saponins of *Medicago* species. *Natural Product Communications*; 1: 1159-1180.

Taylor, A.L. & Sasser, J.N. (1978). Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp.). North Carolina State University, N.C., 111 pp.

Thoden, T.C.; Boppré, M. & Hallmann J. (2007). Pyrrolizidine alkaloids of *Chromolaena odorata* act as nematicidal agents and reduce infection of lettuce roots by *Meloidogyne incognita*. *Nematology* 9: 343-349.

Thoden, T.C.; Boppré, M. & Hallmann, J. (2009). Effects of pyrrolizidine alkaloids on the performance of plant-parasitic and free-living nematodes. *Pest Management Science*, 65: 823-830.

Thorup-Kristensen, K.; Magid, J. & Jensen, L.S. (2003). Catch crops and green manures as biological tools in nitrogen management in temperate zones. *Advances in Agronomy*, 79: 227-302.

Tillman, P.G. & Mullinix, B.G. Jr (2004). Grain sorghum as a trap crop for corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) in cotton. *Environmental Entomology*, 33: 1371-1380.

Timmermans, B.G.H. (2005). *Solanum sisymbriifolium* (Lam.): A trap crop for potato cyst nematodes. Publisher not identified, 135 pp.

Timmermans, B.G.H.; Vos, J.; Stomph, T.J.; Van Nieuwburg, J. & Van der Putten, P.E.L. (2005). Growth duration and root length density of *Solanum sisymbriifolium* (Lam.) as determinants of hatching of *Globodera pallida* (Stone). *Annals of applied Biology*, 148: 213-222.

Tobin, J.D.; Haydock, P.P.J.; Hare, M.C.; Woods, S.R. & Crump, D.H. (2008). Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* and fosthiazate on the multiplication rate of potato cyst nematodes (*Globodera pallida* and *G. rostochiensis*) in potato crops grown under UK field conditions. *Biological Control*, 46 (2): 194-201.

Trudgill, D.L.; Evans, K. & Parrott, D.M. (1975). Effects of potato cyst-nematodes on potato plants. II. Effects on haulm size, concentration of nutrients in haulm tissue and tuber yield of a nematode resistant and a nematode susceptible potato variety. *Nematologica*, 21: 183-191.

Turner, S. J. & Evans, K. (1998). The origin, global distribution and biology of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* Woll. and *Globodera pallida* Stone). In R. J. Marks & B. B. Brodie (Eds.), *Potato cyst nematodes—biology, distribution and control* (7-26 pp.). Wallingford, UK: CAB International.

Turner, S.J. & Fleming, C.C. (2002). Multiple selection of potato cyst nematode *Globodera pallida* virulence on a range of potato species. I. Serial selection on *Solanum*-hybrids. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 461-467.

Urwin, P.E.; Troth, K.M.; Zubko, E.I. & Atkinson, H.J. (2001). Effective transgenic resistance to *Globodera pallida* in potato field trials. *Molecular Breeding*, 8 (1): 95-101.

Vieira, C.P. & Fernandes, B.J. (1999). Plantas inseticidas. In: Simões, C.M. *et al.* (Org.). *Farmacognosia – da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC

739-754 pp.

Wagner, H.; Blatt, S. & Zgainski, E.M. (1984). Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas, Springer Berlin Heidelberg, Second Edition.

Whitehead, A. G. (1991). The resistance of six potato cultivars to English populations of potato cyst-nematodes, *Globodera pallida* and *G. rostochiensis*. *Annals of applied Biology*, 118 (2): 357-369.

Widmer, T.L. & Abawi, G.S. (2000). Mechanism of suppression of *Meloidogyne hapla* and its damage by a green manure of Sudan grass. *Plant Disease*, 84: 562-568.

Winslow, R.; Willis, R.J. & Webster, J.M. (1972). Nematode diseases of potatoes. *Economic nematology*, 17-48 pp.

Wu, H.; Wang, C-J.; Bian, X-W.; Zeng, S-Y.; Lin, K-C.; Wu, B.; Zhang, G-A. & Zhang, X. (2011). Nematicidal efficacy of isothiocyanates against root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on cucumber. *Crop Protection*, 30: 33-37.

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 (3): 315-331.

Youssef, M.M.A. (2013). Potato nematodes and their control measures: a review. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46 (11): 1371-1375.

Zamilpa, A.; Tortoriello, J.; Navarro, V.; Delgado, G. & Alvarez, L. (2002). Five new steroidal saponins from *Solanum chrysotrichum* leaves and their antimycotic activity. *Journal of Natural Products*, 65 (12): 1815-9.

<http://nematode.unl.edu/globds.htm>