



**Instituto Politécnico  
de Viana do Castelo**

**Ana Teresa Alves Leal do Paço**

**Avaliação dos efeitos da enxertia de duas cultivares de feijão-  
verde nas populações de nemátodes fitoparasitas e de bactérias  
fixadoras de azoto.**

**Mestrado em Agricultura Biológica**

**Trabalho efetuado sob a orientação:**

**Professora Doutora Maria Luísa Roldão Marques Moura  
Doutora Sofia Rocha Costa**

**Refóios do Lima, Agosto de 2016**

**As doutrinas expressas neste  
trabalho são da exclusiva  
responsabilidade  
do autor.**

**Aos meus pais  
À Garucha  
Aos meus amigos**

# ÍNDICE

RESUMO.....	VII
ABSTRAT.....	IX
AGRADECIMENTOS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
LISTA DE QUADROS.....	XV
LISTA DE FIGURAS.....	XVI
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A cultura do feijão.....	1
1.1.1.Classificação botânica e centro de origem.....	3
1.1.2.Morfologia e tipo de crescimento.....	3
1.1.3.Condições de produção.....	4
1.1.3.1.Clima e solo.....	4
1.1.3.2.Regas e nutrição.....	5
1.1.3.3.Pragas e doenças.....	6
1.1.3.4.Operações culturais.....	6
1.2. A enxertia de hortícolas.....	7
1.2.1. Técnicas de enxertia e plantas hortícolas.....	8
1.2.2. Vantagens e desvantagens da enxertia.....	10
1.3.Microrganismos no sistema solo-planta.....	11
1.3.1. Nemátodes.....	11
1.3.1.1. Nemátodes-das-lesões-radiculares ( <i>Pratylenchus</i> sp.).....	14
1.3.1.2. Nemátodes-das-galhas-radiculares ( <i>Meloidogyne</i> sp.).....	16
1.3.1.3. Sintomas e estragos nas culturas.....	20
1.3.2. Bactérias fixadoras de azoto.....	23

1.3.2.1.	Importância do azoto na produção vegetal.....	23
1.3.2.2.	O género <i>Rhizobium</i> .....	24
1.3.2.3.	Fixação biológica de azoto.....	27
1.3.3.	Fungos.....	30
1.3.3.1.	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i> .....	30
1.3.3.2.	A doença da suberose radicular e meios de luta.....	32
1.4.	Objetivos do trabalho.....	34
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
2.1.	Delineamento experimental do ensaio em estufa.....	36
2.2.	Extração, identificação e quantificação de nemátodes fitoparasitas.....	39
2.2.1.	Nemátodes fitoparasitas no solo.....	39
2.2.2.	Nemátodes fitoparasitas nas raízes de feijoeiro.....	39
	<i>Meloidogyne</i> spp. ....	39
	<i>Pratylenchus</i> spp. ....	40
2.3.	Avaliação da nodulação e das comunidades de rizóbios nas raízes de feijoeiro.....	41
2.3.1.	Quantificação da nodulação das raízes de feijoeiro por rizóbios..	41
2.3.2.	Isolamento e caraterização morfológica e cultural de rizóbios.....	41
2.3.3.	Caraterização molecular dos isolados de rizóbios.....	42
2.4.	Avaliação da incidência e severidade de suberose radicular ( <i>Pyrenochaeta lycopersici</i> ).....	43
2.5.	Determinação de peso seco e peso fresco das raízes de feijoeiro.....	44
2.6.	Análise estatística dos resultados.....	44
3.	RESULTADOS.....	45
3.1.	Nemátodes fitoparasitas.....	45
3.1.1.	Nemátodes fitoparasitas no solo.....	45
3.1.2.	Nemátodes fitoparasitas nas raízes de feijoeiro.....	50

3.2. Comunidades de rizóbios nas raízes de feijoeiro.....	52
3.2.1. Nodulação das raízes.....	52
3.2.2. Caraterização morfológica e cultural dos isolados de rizóbio.....	53
3.2.3. Caraterização molecular dos isolados de rizóbios.....	54
3.3. Incidência e severidade de suberose radicular ( <i>Pyrenochaeta lycopersici</i> ).....	57
3.4. Peso fresco e peso seco das raízes de feijoeiro.....	58
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	60
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ANEXOS.....	76

## RESUMO

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é uma leguminosa que tem um lugar importante na dieta alimentar portuguesa, no consumo fresco e em seco. Do ponto de vista agronómico, é uma espécie importante para incluir nas rotações de culturas, visto possuir vantagens ao nível da fertilidade e da estrutura do solo. No entanto, nos dias de hoje, assiste-se a uma diminuição da produção da cultura de feijão-verde, tanto a nível nacional como a nível mundial. Esta diminuição deve-se às doenças e pragas que afetam a cultura e que levam a uma redução na sua produção.

Os nematodes-das-galhas-radiculares (*Meloidogyne* spp.) e os nemátodes do género *Pratylenchus* constituem um grave problema na produção da cultura de feijão-verde podendo afetar a qualidade e a produtividade da produção. Uma vez que esta cultura é consumida praticamente em todo o mundo, e em algumas dietas é a fonte principal de proteína, é importante que se adotem medidas de modo a reverter esse processo. Tendo em conta que o uso de produtos químicos utilizados como meios de proteção contra doenças é bastante dispendioso, nocivo para a saúde e para o ambiente e que nem sempre resolvem por completo os problemas, é importante estudar outros métodos e técnicas eficazes de modo a garantir uma produção de qualidade.

A enxertia é uma técnica que tem vindo a ser utilizada em muitos países produtores de culturas hortícolas, incluindo Portugal. Na enxertia recorre-se à utilização de porta-enxertos resistentes ou tolerantes a patogéneos do solo, e nele são enxertadas cultivares comerciais susceptíveis aos patogéneos, mas que possuem as características produtivas pretendidas. Consegue-se com esta técnica reduzir os prejuízos causados pelas doenças do solo, e evitar o uso indiscriminado de pesticidas.

Neste trabalho pretendemos estudar os efeitos da enxertia das cultivares de feijão-verde Fasili e Oriente em quarto porta-enxertos, nas populações de nemátodes fitoparasitas (*Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp.), na formação de nódulos de bactérias fixadoras de azoto e na incidência da doença da suberose radicular causada pelo fungo *Pyrenochaeta lycopersici*. Pretendemos ainda avaliar o efeito da enxertia na produção de biomassa de raízes de feijão-verde produzido em estufa. O ensaio experimental decorreu no solo da estufa da Escola Superior Agrária de Ponte de Lima/IPVC, na Primavera/Verão de 2014. Realizaram-se duas recolhas de raízes para análise, uma a meio do ciclo da cultura a 1 de Julho e uma segunda no final da cultura em Agosto de 2014. Quantificou-se o número de galhas de nemátodes *Meloidogyne* spp.

(nemátode das galhas radiculares - NGR) e o número de massas de ovos, o número de nemátodes *Pratylenchus* spp. extraídos das raízes mais finas, o número de nódulos de rizóbios, e a severidade da doença da suberose radicular. Registou-se ainda o peso fresco e seco das raízes de feijoeiro das diferentes combinações porta-enxerto/cultivar enxertada. A partir dos nódulos de rizóbio, isolaram-se as bactérias em laboratório e procedeu-se à caracterização fenotípica e molecular.

O estudo dos nemátodes fitoparasitas presentes nas suspensões do solo, permitiram identificar um total de sete géneros de nemátodes nos vários tratamentos e datas de amostragem do ensaio: os ectoparasitas *Helicotylenchus*, *Paratylenchus*, *Rotylenchus*, *Tylenchorhynchus* e *Xiphinema*; e os endoparasitas *Meloidogyne* e *Pratylenchus*.

Os resultados mostraram que as populações naturais de nemátodes, rizóbio e *P. lycopersici* presentes no solo infetaram as raízes dos porta-enxertos em estudo. Nenhum dos tratamentos realizados (porta-enxerto/cultivar enxertada) mostrou ser simultaneamente resistente aos nemátodes dos géneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus*. O tratamento que conduziu a melhores resultados contra *Meloidogyne* spp. e *P. lycopersici*, foi o tratamento OO (Oriente enxertado em Oriente), enquanto que para o género *Pratylenchus* o tratamento mais aconselhável foi o FF (Fasili enxertado em Fasili). No que diz respeito à infeção por rizóbio não pareceu haver uma separação entre os tratamentos de plantas enxertadas em si próprias ou as plantas não enxertadas. A análise da diversidade genética dos isolados de *Rizobium* obtidos das raízes de plantas da cv. Feijão de 7 anos (*P. coccineus*), uma espécie de feijoeiro diferente das cvs. Fasili e Oriente (*P. vulgaris*), mostrou que as bactérias que infetaram estas duas espécies de feijão são diferentes, e não ficaram agrupadas no mesmo grupo.

**Palavras - chave:** cv. *fasili*, cv. *oriente*, enxertia, *Meloidogyne*, *Phaseolus vulgaris*, *Pratylenchus*, produtividade, *Pyrenochaeta lycopersici*, qualidade, *Rhizobium*.

## ABSTRACT

The bean (*Phaseolus vulgaris*) is a legume that has an important place in the Portuguese diet, whether eaten dry or fresh. From an agronomic point of view, it is an important species to include in crop rotations, as it possesses advantages in terms of fertility and soil structure. However, today, we are witnessing a decrease in the production of green beans culture, both nationally and globally. This decrease is due to diseases and pests affecting the crop, leading to lower production.

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and gender *Pratylenchus* nematodes are a serious problem in the production of green beans culture and can affect the quality and productivity of production. Since this culture is consumed almost worldwide, and in some diets is the main source of protein, it is important to take measures to reverse the process. Given that the use of chemical products used as protection against disease means is quite expensive, harmful to health and the environment and that does not always solve completely the problems, it is important to study other effective methods and techniques to ensure the quality of production.

Grafting is a technique that has been used in many countries producing horticultural crops, including Portugal. Grafting refers to the use rootstock resistant or tolerant to soil pathogens and there are grafted cultivars susceptible to pathogens, but which have the desired characteristics production. With this technique one is able reduce the damage caused by soil-borne diseases, and avoid the indiscriminate use of pesticides.

In this work we intend to study the effects of grafting of green beans cultivars Fasili and East fourth rootstocks, in populations of plant parasites nematodes (*Meloidogyne* spp. and *Pratylenchus* spp.), in the formation of nitrogen fixing bacteria nodules and incidence corky root of disease caused by the fungus *Pyrenochaeta lycopersici*. We also intend to evaluate the effect of grafting on the biomass of roots green beans produced in greenhouse. The experimental test took place on the soil of greenhouse Agricultural School of Ponte de Lima / IPVC in spring / summer 2014. There were two collections of roots for analysis, one half of the cycle on 1 July and a second at the end of culture in August 2014. Quantified the number of galls of nematodes *Meloidogyne* spp. (Root-knot nematodes-RKN), and the number of egg masses, the number of nematode *Pratylenchus* spp. extracted the fine roots, the number of rhizobia nodes, and the severity of corky root disease. There has still fresh and dry

weight of the bean roots of different combinations rootstock / cultivar grafted. From the rhizobia nodules were isolated bacteria in laboratory and proceeded to phenotypic and molecular characterization.

The present study of phytoparasitic nematodes in soil suspensions, identified a total of seven genera of nematodes in the various treatments and test sampling dates: ectoparasites *Helicotylenchus*, *Paratylenchus*, *Rotylenchus*, *Xiphinema* and *Tylenchorhynchus*; and endoparasites *Meloidogyne* and *Pratylenchus*.

The results showed that the natural populations of nematodes, rhizobia and *P. lycopersici* in the soil infect only the roots of the rootstocks under study. None of the treatments (rootstock / cultivar grafted) proved to be simultaneously resistant to nematodes of *Meloidogyne* and *Pratylenchus* genera. The treatment led to better results against *Meloidogyne* spp. and *P. lycopersici* was OO treatment (Middle East grafted), while for the genus *Pratylenchus* most advisable treatment was FF (Fasili grafted Fasili). With regard to infection by rhizobia, does not appear to be a separation between treatments grafted plants or the plants themselves ungrafted. Analysis of genetic diversity of *Rhizobium* isolates obtained from cv. plant roots. Bean 7 years (*P. coccineus*), a different kind of bean from cvs. Fasili and East (*P. vulgaris*), showed that the bacteria that infect only these two bean species are different, and were not grouped in the same group.

**Keywords:** cv. *fasili*, cv. *Oriente*, grafting, *Meloidogyne*, *Phaseolus vulgaris*, *Pratylenchus*, productivity, *Pyrenochaeta lycopersici*, quality, *Rhizobium*,.

## AGRADECIMENTOS

Ao entregar este trabalho, é com o maior prazer, que agradeço a todos os que de alguma forma contribuíram para a sua realização.

À Professora Doutora Luísa Moura, pela orientação deste trabalho. Pelos conselhos e conhecimentos partilhados ao longo do trabalho. Pelo incentivo, encorajamento, quando a força para continuar faltava. Obrigada pela confiança e apoio em todas as etapas do trabalho.

À Doutora Sofia Costa pelo constante acompanhamento na realização do trabalho laboratorial e escrito, ensinamentos e partilha de conhecimentos.

À Professora Doutora Teresa Almeida do Departamento de Biologia da Universidade do Minho. pela amizade, apoio, ensinamentos e dedicação dispensada na identificação e contabilização de nemátodes *Pratylenchus*.

À Professora Doutora Isabel Mourão e Professor Doutor Miguel Brito pelo apoio no desenvolvimento do ensaio de campo.

Aos funcionários do laboratório da ESAPL, que sempre me auxiliaram nas tarefas realizadas no laboratório, com carinho.

À minha irmã Ana Margarida e aos estagiários Joana Lima e Manuel Mesquita pela colaboração na determinação dos pesos secos das raízes do ensaio.

À ESAPL pelas estruturas e apoio fornecido durante o curso. As excelentes infra-estruturas laboratoriais e estufa, suporte fundamental para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos Alexandre Machado e Nuno Cruz pela ajuda no Abstract e na formatação da tese.

E sobretudo aos meus colegas do projecto do feijão, Cristiana Ribeiro, Ruben Ferreira, Diogo Pereira e Maria Martins pela partilha de tarefas, de dados, de conhecimentos. Uma verdadeira equipa.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

NGR- Nemátodes-das-galhas-radiculares

INE- Instituto Nacional de Estatística

TLG- Transferência lateral de genes

J1- primeiro estágio juvenil

J2- segundo estágio juvenil

EM- Extrato de Levedura – manitol

YM- Yeast manitol

YMA- Yeast manitol agar ou Agar manitol levedura

ATP Adenosina Tri Fosfato

P1- Porta- enxerto 1

P2- Porta- enxerto 2

F- Cultivar Fasili

FF- Cultivar Fasili enxertada em Fasili

FP1- Cultivar Fasili enxertada no porta-enxerto 1

FP2- Cultivar Fasili enxertada no porta- enxerto 2

O- Cultivar Oriente

OO- Cultivar Oriente enxertada em Oriente

OP1- Cultivar Oriente enxertada no porta-enxerto 1

OP2- Cultivar Oriente enxertada no porta-enxerto 2

FBN- Fixação biológica de azoto

cv.- Cultivar

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1.3.3 Principais pragas da cultura do feijão (Almeida, 2006).....	6
Quadro 1.3.2.3. Estádios para a formação dos nódulos e fenótipos causados nas raízes (Araújo & Hungria, 1994).....	29
Quadro 2.1. Cultivares de feijoeiro utilizadas em cada um dos tratamentos e respectivas abreviaturas.....	36
Quadro 2.3.3 – Isolados de rizóbio obtidos das raízes de feijoeiro do ensaio em estufa e selecionados para caracterização molecular.....	42
Quadro 2.3.3.1. Programa de PCR para a amplificação de sequências repetidas pelo primer BOX A1R.....	42
Quadro 2.4. Escala de valores utilizada para avaliação de sintomas de suberose radicular (Palminha, 1988 e Moura, 1993).....	43
Quadro 3.1.1. Diferença entre a média do número de nemátodes fitoparasitas no solo, no final da cultura e a média do número de nemátodes fitoparasitas no solo, no início da cultura.....	48
Quadro 3.1.1.1. Média do número de géneros de nemátodes presentes no solo antes e após da cultura do feijoeiro.....	49
Quadro 3.1.2. Número de massas de ovos e ovos de <i>Meloidogyne</i> spp. presentes nas raízes das plantas dos tratamentos F, FF, O e OO, na amostragem intermédia e final...50	
Quadro 3.1.2.1. Número de nematodes <i>Pratylenchus</i> spp. presentes nas raízes das plantas dos tratamentos F, FF, O e OO, nas amostragens intermédia e final.....	51
Quadro 3.2.2. Caracterização cultural dos isolados de rizóbios.....	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.3.1.2. Ciclo de vida do nemátode das galhas radiculares (adaptado de Mitkowski & Abawi, 2003).....	17
Figura 1.3.3.1. Ciclo de vida do fungo <i>Pyrenochaeta lycopersici</i> (Hasna, 2007).....	31
Figura 1.3.3.2. Sintomas de suberose radicular em raízes de feijão-verde ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).....	33
Figura 2.1. Localização da área da estufa onde decorreu o ensaio de feijão – verde enxertado.....	36
Figura 2.1.1. Distribuição dos tratamentos nos talhões experimentais e esquema de plantação do ensaio.....	37
Figura 2.1.2. Esquema de plantação de cada talhão, considerando tratamentos com plantas normais ou enxertadas.....	38
Figura 3.1.1. Número de nemátodes <i>Helicotylenchus</i> spp. no solo no início (Pi) e no final da cultura (Pf) do feijoeiro, nos tratamentos F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria. Os valores são a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....	45
Figura 3.1.1.1. Número de nemátodes <i>Xiphinema</i> spp. no solo no início (Pi) e no final da cultura (Pf) do feijoeiro nos tratamentos F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria. Os valores são a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....	45
Figura 3.1.1.2. Número de nemátodes <i>Meloidogyne</i> spp. no solo no início (Pi) e no final da cultura (Pf) do feijoeiro nos tratamentos F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria. Os valores são a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....	46

Figura 3.1.1.3. Número de nemátodes <i>Pratylenchus</i> spp. no solo no início (Pi) e no final da cultura (Pf) do feijoeiro nos tratamentos F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria. Os valores são a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....	46
Figura 3.1.1.4. Número de nemátodes <i>Rotylenchus</i> spp. no solo no início (Pi) e no final da cultura (Pf) do feijoeiro nos tratamentos F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria. Os valores são a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....	47
Figura 3.1.1.5. Número de <i>Paratylenchus</i> spp. no solo no início (Pi) e no final da cultura (Pf) do feijoeiro nos tratamentos F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria. Os valores são a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....	47
Figura 3.1.1.6. Número de nemátodes <i>Tylenchorhynchus</i> spp. no solo no início (Pi) e no final da cultura (Pf) do feijoeiro nos tratamentos F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria. Os valores são a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....	48
Figura 3.1.2. Número de galhas detectadas por sistema radicular de feijoeiro nas amostragens intermédia e final dos tratamentos do ensaio F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; FP1- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P1; FP2- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P2; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria; OP1- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P1; OP2- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P2. Os valores são a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....	50
Figura 3.2.1. Número de nódulos de rizóbio detectadas por sistema radicular de feijoeiro nas amostragens intermédia e final dos tratamentos do ensaio F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; FP1- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P1; FP2- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P2; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria; OP1- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P1; OP2- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P2. Os valores são a média $\pm$ erro padrão de 3 repetições.....	51

Figura 3.2.3. Perfis de DNA dos isolados de rizóbios obtidos das raízes de feijoeiro dos vários tratamentos do ensaio. Marcador utilizado 1kb DNA Ladder.....53

Figura 3.2.3.1. Perfis de DNA dos isolados de rizóbios obtidos das raízes de feijoeiro dos vários tratamentos do ensaio. Marcador utilizado 1kb DNA Ladder.....54

Figura 3.2.3.2. Dendograma de similaridades genética construído com base nos perfis de DNA de 24 estirpes de rizóbios isoladas das raízes de feijoeiro do ensaio em estufa .....55

Figura 3.3. Nível de Suberose identificado por sistema radicular de feijoeiro na amostragem final dos tratamentos do ensaio F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; FP1- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P1; FP2- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P2; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria; OP1- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P1; OP2- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P2. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.....56

Figura 3.4. Peso fresco da parte radicular do feijoeiro nas amostragens intermédia e final dos tratamentos do ensaio F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; FP1- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P1; FP2- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P2; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria; OP1- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P1; OP2- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P2. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.....57

Figura 3.4.1. Peso seco da parte radicular do feijoeiro nas amostragens intermédia e final dos tratamentos do ensaio F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; FP1- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P1; FP2- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P2; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria; OP1- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P1; OP2- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P2. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.....57

## 1.Introdução

### 1.1. A cultura do feijão

O feijão é uma das culturas mais importantes no mundo a nível agronómico, nutricional, económico e ambiental (Ribeiro, 2014). Em muitas regiões do mundo continua a ser a leguminosa mais consumida na dieta humana devido às suas características nutricionais. É usado como fonte de proteína, possui um bom teor de hidratos de carbono, fibras, minerais, vitaminas, e um teor reduzido de lípidos. O seu teor em ferro é semelhante ao encontrado na carne bovina, e é também uma boa fonte de cálcio, fósforo, potássio, magnésio, cobre e zinco. É considerado também uma boa fonte de vitaminas do complexo B e ácido fólico, sendo reconhecidas as suas propriedades reguladoras dos níveis de glicémia e insulina. Os seus compostos fenólicos podem reduzir a incidência de doenças (Afonso, 2010). É cultivado pelas suas sementes secas, ou pelas vagens imaturas, designado neste caso por feijão-verde. Os povos nativos da América que domesticaram o feijão consumiam as sementes, enquanto o consumo da vagem imatura só ocorreu depois da introdução da cultura na Europa. A vagem é comercializada em fresco ou após transformação industrial, normalmente sob a forma de produto congelado (Almeida, 2006).

Em termos ambientais, um importante atributo das leguminosas, nas quais se inclui o feijão, está na capacidade de fixar o azoto atmosférico através de processos biológicos. Estas plantas, numa simbiose com determinados tipos de bactérias, designadas genericamente ao longo deste trabalho por rizóbio (ex. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*), são capazes de converter o azoto atmosférico em compostos azotados que são utilizados pelas plantas em crescimento, enriquecendo assim a fertilidade dos solos (Nulik et al., 2013). A simbiose estabelecida entre raízes do feijão e bactérias do género *Rhizobium*, permite que as bactérias presentes nos nódulos formados nas raízes fixem o azoto atmosférico, reduzindo ou eliminando a necessidades de utilização de fertilizantes azotados. Esta simbiose contribui para a fertilidade do solo, ajudando a melhorar a sua estrutura e a capacidade de retenção de água, contribui para a constituição de um sistema radicular mais profundo, protegendo o solo da ação dos agentes erosivos e contribui para uma maior atividade biológica e sustentabilidade dos solos (Biederbeck et al., 2005)

Adicionalmente, este grupo de bactérias poderá ter também um importante papel na indução de defesas contra doenças graves que causam prejuízos no feijoeiro, como os nemátodes do género *Meloidogyne* (nemátodes-das-galhas-radiculares) (Ribeiro, 2014). Estima-se que as leguminosas sejam capazes de fixar entre 72 a 350kg de azoto por hectare por ano (Frame, 2005). Adicionalmente, algumas espécies de leguminosas são capazes de tornar o fósforo assimilável pela planta, que também desempenha um papel importante na sua nutrição (Rose et al., 2010). Estas duas características são particularmente importantes para a redução dos recursos utilizados (*low-input*) nos sistemas de produção agrícola e para os princípios agro-ecológicos, pois permitem uma redução drástica do uso de fertilizantes. Ao mesmo tempo, rotações que incluem culturas de leguminosas possibilitam que as culturas que se seguem na rotação beneficiem do azoto incorporado no solo. O uso de leguminosas secas<sup>(1)</sup> autóctones como o feijão, pode contribuir para melhorar a segurança alimentar, pois estas estão adaptadas aos sistemas de produção e de consumo locais. Por fim, é importante referir que as leguminosas secas são muito versáteis e podem ser usadas em diferentes sistemas de produção agrícola, integrando rotações, culturas hortícolas, pastagens e também, como culturas de cobertura.

Em Portugal a produção de feijão-verde ocorre um pouco por todo país, quer para autoconsumo quer para comércio. A principal zona de produção é o Ribatejo e Oeste, onde esta é a segunda cultura a ser produzida a seguir ao tomate (Almeida, 2006). Produz-se também no Algarve na Beira Litoral e no Entre Douro e Minho, em estufa e ao ar livre (Almeida, 2006).

(1) De acordo com a FAO (2014), apenas as leguminosas colhidas para obter a semente seca são classificadas de leguminosas secas, tais como diversas espécies de feijão, nomeadamente *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. angularis*, *P. aureus*, *P. mungo*, *P. coccineus*, *P. calcaratus*, *P. aconitifolius* e *P. acutifolius*. As espécies de leguminosas usadas como hortícolas (ex. ervilha, feijão verde), para extração de óleo (ex. soja, amendoim) ou para forragem (ex. trevo, luzerna) não são consideradas leguminosas secas.

De acordo com as estatísticas agrícolas de 2014 (INE, 2014) a área ocupada por feijão-verde em Portugal, aumentou entre 2012-2014, tendo-se observado um ligeiro decréscimo em 2013, mas que aumentou em 2014, totalizando 825 ha. Apesar de ligada à dieta mediterrânea, a produção de feijão para grão, e segundo dados do INE, tem vindo a diminuir nos últimos anos, constatando-se que produção de feijão-verde é superior à produção de feijão para grão, (Ribeiro, 2014).

Considerando a produção mundial de feijão-verde, o continente Asiático domina a produção (91%), seguindo-se o continente Europeu com 4% e os restantes continentes totalizam apenas 4,9% (FAO, 2013). Dado que o continente Asiático é o maior produtor de feijão-verde, verifica-se que os cinco países com maior produção desta cultura são a China com cerca de 16 milhões de toneladas, seguindo-se a Indonésia com cerca de 900 mil toneladas e com menos importância a Turquia, Índia e a Tailândia (FAO, 2013).

### **1.1.1. Classificação botânica e centro de origem**

O feijão comum e o feijão-verde pertencem à família Fabaceae (= Leguminosae) e ao género *Phaseolus*, que inclui atualmente cerca de 56 espécies agrupadas na tribo *Phaseoleae*. Por vezes consideram-se duas subespécies: *Phaseolus vulgaris* subsp. *nanus*, o feijão rasteiro e *P. vulgaris* subsp. *volubilis*, o feijão de trepar (Almeida, 2006). O antepassado silvestre do feijão é classificado como *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* (sin. *P. aborigineus*). Segundo o mesmo autor, o feijão teve origem na América Central e a sua especialização ocorreu possivelmente na região intertropical da América.

Afonso (2010) refere a existência de três centros primários de diversidade genética do feijão: (i) o mesoamericano, que se estende desde o Sudeste dos Estados Unidos até ao Panamá, tendo como zonas principais o México e a Guatemala; (ii) o Sul dos Andes, desde o Norte do Peru até às províncias do noroeste da Argentina e (iii) o Norte dos Andes, desde a Colômbia e Venezuela até ao Norte do Peru. Outros centros secundários de diversidade genética foram também identificados em algumas regiões da Europa, Ásia e África, onde foram introduzidos genótipos americanos de feijão.

Os padrões de disseminação do feijão para a Europa e nos países europeus foram muito complexas, com várias introduções do Novo Mundo que foram combinadas com trocas diretas entre os países europeus e outros países mediterrânicos (Angioi et al., 2010).

### **1.1.2. Morfologia e tipo de crescimento**

O feijão é uma planta herbácea, cujo ciclo de vida varia entre os 65 a 120 dias, dependendo da cultivar (ciclo curto ou longo) e das condições de produção. É uma cultura anual, com sistema radicular apurado, superficial e pouco extenso. As folhas

são compostas, trifoliadas e pecioladas. As flores podem ser brancas, rosa, roxo, ou também vermelho em *P. coccineus*. As flores surgem na axila das folhas, agrupadas em cachos determinados com 3 a 8 flores. As flores são perfeitas, possuem um cálice com cinco sépalas e uma corola de cinco pétalas, de forma papilionácea (Almeida, 2006).

A polinização de *P. vulgaris* é autogâmica, embora na espécie *P. coccineus* seja predominantemente alogâmica (Sicard et al., 2005). A deiscência das anteras em *P. vulgaris* ocorre imediatamente antes da abertura da flor, normalmente durante a noite. A fertilização dá-se cerca de 12 horas após a antese. Nesta fase, a fertilização de alguns óvulos pode não ocorrer se a temperatura for inferior a 10°C (ou mesmo 14°C nalgumas cultivares), originando nesta situação vagens deformadas. Temperaturas baixas (8°C) prejudicam a viabilidade dos óvulos e temperaturas superiores a 30°C reduzem a viabilidade do pólen.

A semente do feijão pode apresentar diversas formas (redonda ou arredondada, elíptica, ou reniforme), e apresentam uma ampla variabilidade de cores (branca, creme, vermelha, preta, rosa, roxa, alaranjada entre outras), dependendo da cultivar (Debouck, 1991).

Quanto aos tipo de crescimento, e de acordo com Almeida (2006) podem ser considerados quatro tipos de crescimento no feijão:

Tipo I – Determinado rasteiro;

Tipo II – Indeterminado rasteiro;

Tipo III – Indeterminado ramificado;

Tipo IV – Indeterminado de trepar

Nas cultivares rasteiras e determinadas, o crescimento vegetativo termina pouco depois do aparecimento das flores; nas cultivares de trepar indeterminadas, a produção de folhas ocorre em simultâneo com a floração.

### **1.1.3. Condições de Produção**

#### **1.1.3.1. Clima e solo**

O feijão tem preferência por solos de textura média, com boa drenagem, ricos em matéria orgânica e valores de pH de 6,0 a 6,5 (Mourão et al., 2006). É sensível à seca e ao encharcamento, sendo uma espécie muito sensível à salinidade do solo e da água de rega. Valores de pH superiores a 7,5 induzem clorose férrica (Almeida, 2006).

Quanto às exigências climáticas, e de acordo com o mesmo autor, o feijão é uma cultura mesotérmica, sensível à geada. Na maioria das cultivares a emergência ocorre quando se acumulam 30°C ( $T_0 = 7,7^\circ\text{C}$ ), a germinação é epígia, por isso, sensível à presença de crostas superficiais no solo. Para uma germinação e uma emergência homogêneas, a temperatura do solo ou do substrato deve ser superior a 14°C. Os grandes frios, os ventos fortes e as geadas são fatores a que o feijoeiro é muito sensível. Em virtude da suscetibilidade às geadas, a cultura só é viável fora da época em que não é previsível a ocorrência destes agentes meteorológicos (Ripado, 1992), ou então recorre-se à produção em estufa.

### **1.1.3.2. Rega e nutrição**

A cultura do feijão-verde é muito exigente em água sendo sensível ao déficit e excesso hídrico. Neste caso, na altura da sementeira causa um atraso na germinação e na emergência, podendo provocar uma paragem do crescimento da parte aérea e do sistema radicular. O tipo de rega mais generalizado para esta cultura é a rega gota-a-gota. O período mais crítico da falta de água é na floração e no início do vingamento das vagens.

No caso da sementeira direta o solo deve manter uma humidade adequada para permitir uma adequada absorção de água pela semente e promover a uniformidade da germinação. No caso de ser realizada a transplantação de jovens plantas de viveiro, deve-se efetuar uma rega imediatamente após a plantação, para facilitar o contacto das raízes com o solo. No período da colheita deverá fazer-se uma rega após cada colheita (MADRP/DGPC-2006).

No que se refere à fertilização, deve ser feita uma fertilização de fundo, com compostos amadurecidos, na dose de 20 a 30 t/ha. Como complemento podem ser utilizados fertilizantes orgânicos comerciais e se os valores de fósforo e potássio do solo forem inferiores a 120 µg/g recomenda-se a aplicação de fosfatos naturais e sais de potássio nas doses de 45 kg/ha de  $\text{P}_2\text{O}_5$  e de  $\text{K}_2\text{O}$ , respetivamente (Mourão et al., 2006).

### 1.1.3.3. Pragas e doenças

Um dos principais fatores responsáveis pela baixa produtividade do feijão é a ocorrência de pragas (Quadro 1.1.3.3.) e doenças, causadas por bactérias, vírus, fungos e nemátodes que limitam a produção de feijão e reduzem a qualidade fisiológica, microbiológica, nutricional e comercial do produto.

Entre as doenças bacterianas referem-se entre outras as causadas por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Em relação às doenças causadas por fungos destacam-se as doenças do solo, nomeadamente a fusariose vascular (*Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*), podridão radicular (*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*) e ainda as causadas por *Rhizoctonia solani*, *Thielaviopsis basicola* e *Pythium* spp. Dos diversos nemátodes que podem infetar o feijoeiro, referem-se *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp. que normalmente provocam estragos nesta cultura (Schwartz & Harveson, 2015).

**Quadro 1.1.3.3 Principais pragas da cultura do feijão (Almeida, 2006)**

Nome vulgar	Género ou Espécie
Ácaros	<i>Tetranychus</i> spp.
Afídeos	<i>Aphis craccivora</i> , <i>Aphis fabae</i> , <i>Acyrtosiphon pisum</i> , <i>Myzus persicae</i>
Alfinete	<i>Agriotis</i> spp.
Broca do milho	<i>Ostrinia nubilalis</i>
Gorgulho ou carneiros	<i>Acanthoscelides obtectus</i> , <i>Bruchus rufimanus</i>
Lagarta de fruto	<i>Helicoverpa armigera</i>
Lagarta das folhas	<i>Autographa gamma</i> , <i>Chrysodeixis chalcites</i> , <i>Thysanoplusia orichalcea</i>
Larvas mineiras	<i>Liriomyza</i> spp.
Mosca das sementes	<i>Delia platura</i>
Moscas brancas	<i>Trialeurodes vapporarium</i> , <i>Bemisia tabaci</i>
Piral do feijão	<i>Etiell zincknella</i>
Scutigerela	<i>Scutigerella immaculata</i>
Trips	<i>Thrips tabaci</i> , <i>T. flavus</i> , <i>Frankliniella occidentalis</i> , <i>F. intonsa</i>

### 1.1.3.4. Operações culturais

A cultura do feijão-verde é uma cultura de Primavera/Verão, com épocas de sementeira ou plantação que variam de região para região do país. Pode ser realizada ao ar livre ou em estufa, neste caso para produção de vagens (ou feijão-verde). Realizada ao ar livre instala-se por sementeira direta, ficando as sementes a uma profundidade de 2 a 3cm (Kreuter, 2012). Em estufa utilizam-se jovens plantas produzidas em viveiro,

com raiz protegida por substrato (em alvéolos ou mottes), transplantadas para o local definitivo quando têm cerca de duas folhas verdadeiras desenvolvidas. Para ultrapassar problemas fitossanitários associados à presença de nemátodes e fungos do solo como *Fusarium*, alguns produtores recorrem à utilização de plantas enxertadas.

Para as variedades de pequeno porte, deve utilizar-se um compasso de 0,40 m entre linhas e de 0,60 m na linha. Nas variedades de trepar, a cultura é instalada em linhas pareadas distanciadas de 0,40 m, e 1,25 m entre o par de linhas (MADRP/DGPC-2006). Nas cultivares de trepar de crescimento indeterminado é necessário tutorar a cultura, e por vezes há a opção de despontar as plantas à altura do arame.

A colheita das vagens é feita escalonadamente, durante aproximadamente três meses (Mourão et al., 2006) enquanto a cor da vagem for verde brilhante, mas antes que as sementes se desenvolvam significativamente e as vagens se tornem fibrosas e percam o brilho. Nas culturas destinadas à indústria, a colheita é desenvolvida de forma mecânica e pode ser efetuada com base no cálculo de dias ou grau de crescimento (Almeida, 2006).

### **1.2.A enxertia de hortícolas**

A intensificação da produção convencional de culturas hortícolas em estufa com repetição anual das culturas no mesmo solo e utilização de fertilizantes e pesticidas de síntese tem provocado o aumento da incidência de doenças no solo (Moura, 1993; Mourão & Brito, 2014), problema que pode ser atenuado com o recurso à enxertia de plantas (Costa, 2014). É uma técnica segura para o ambiente e de fácil gestão, podendo substituir a desinfecção do solo por vapor de água, particularmente interessante no modo de produção biológico (Mourão & Brito, 2014).

A enxertia é uma técnica centenária, que surgiu no início do sec. XX, na Coreia e no Japão e é utilizada em vários setores da agricultura. Na Europa surgiu na Holanda, ligada à horticultura, no final dos anos 40 (Rodrigues, 2009). Atualmente, na Espanha, Holanda e Japão utiliza-se a enxertia como forma de controlo de doenças provocadas por patógenos do solo, com custos reduzidos (Teixeira, 2013).

Em Portugal, os primeiros ensaios de enxertia realizaram-se em 1999, em tomateiro, pela empresa Aromas e Flores (Rodrigues, 2009) seguido da melancia e do pepino, em 2002, com o objetivo de aumentar a produção e qualidade das cultivares comerciais produzidas em cultura protegidas (Teixeira, 2013).

No entanto, a produção comercial de tomate utilizando plantas enxertadas iniciou-se apenas em 2007 (Rodrigues, 2009). Desde então, a procura por plantas enxertadas para produção em estufa tem aumentado significativamente. Em Portugal, em 2008, a área total de cultivo de tomate para consumo fresco e para o processamento foi de cerca de 13.000 ha, o que representava 1,1 milhões de toneladas, e hoje, mais de metade da área de tomate fresco é baseada em plantas enxertadas. A maioria destas plantas chegam de Espanha, mas a produção de plantas de tomateiro enxertadas tem aumentado rapidamente em viveiros portugueses nos últimos anos. Em 2009, plantaram-se aproximadamente 170 ha (1 200 000 plantas) de tomateiro enxertado nas estufas portuguesas e, em 2010, esperava-se 220 ha (FLF, 2010, *in* Vaz, 2015). A cultura da melancia com plantas enxertadas também se tem desenvolvido, tendo a empresa Aromas e Flores comercializado em 2009, 700 mil plantas enxertadas de melancia, equivalente a 280 hectares de produção em Portugal e em Espanha (FLF, 2010, *in* Vaz, 2015). Além do tomate e melancia, outras culturas como o pepino, pimento, melão e feijão-verde, produzidas a partir de plantas enxertadas, têm aumentado significativamente de superfície cultivada (Mourão & Brito, 2014; Vaz, 2015).

Ao nível da investigação os estudos têm incidido principalmente no estudo da resistência de porta-enxertos a doenças tais como a suberose radicular (*Pyrenochaeta lycopersici*) e fusariose vascular (*Fusarium oxysporum*) e ainda a nematodes-das-galhas-radiculares (*Meloidogyne* spp.). Estudam-se ainda os efeitos de diferentes porta-enxertos na produtividade, qualidade e período de colheita de cultivares hortícolas mais utilizadas, e os sistemas de condução mais adequados (Mullin & Abawi, 1991; Moreira, 2012; Mourão et al., 2012; Wesemael & Moens, 2012; Costa et al., 2016).

### **1.2.1. Técnicas de enxertia e plantas hortícolas**

A enxertia é definida como a união de duas partes de plantas vivas que conduzem ao crescimento e desenvolvimento de uma única planta, resultando o seu sucesso, do contato íntimo do câmbio das plantas (Mourão & Brito, 2014).

O porta-enxerto pode induzir resistência/tolerância a várias doenças do solo (Mourão & Brito, 2014), como *Pyrenochaeta lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Pseudomonas solanacearum*, *Verticillium albo-atrum* (Teixeira, 2013) e resistência a nemátodes (Mullin & Abawi, 1991; Wesemael & Moens, 2012; Costa et al., 2016). Contribui também, para melhorar a absorção e/ou a eficiência de utilização

de nutrientes pelas plantas, aumentando a tolerância à salinidade, e diminuindo os sintomas de stresse de nutrientes (Mourão & Brito, 2014). Confere ainda tolerância a altas e baixas temperaturas e a solos demasiado húmidos. O crescimento da planta é mais rápido e vigoroso e a quantidade e qualidade dos frutos aumenta, sem afetar a tipologia dos mesmos (Rodrigues, 2009).

Pelo exposto, e de acordo com Ferreira (2015) o sucesso da enxertia depende de vários fatores entre os quais se destacam as características do porta-enxerto que se considera serem as seguintes:

- Imunidade à doença que se pretende controlar, quando este for o objetivo da enxertia;
- Boa resistência aos restantes patogéneos do solo;
- Vigor e rusticidade;
- Boa afinidade com a cultivar enxertada;
- Boas condições morfológicas (tamanho certo do hipocótilo no momento da enxertia, consistência, etc.).

Por fim, e de acordo com o mesmo autor, refere-se que um porta-enxerto vigoroso leva a que a planta enxertada também seja vigorosa, o que permite diminuir a densidade de plantação, sem que haja prejuízos a nível da produção, podendo diminuir o custo da instalação da cultura. Pode possibilitar também, o cultivo de algumas variedades mais cedo e por um período de tempo mais longo, uma vez que as raízes do porta-enxerto, conseguem desenvolver-se em condições de temperatura do solo mais baixas.

As técnicas de enxertia de culturas hortícolas são diversas (Vaz, 2015) e variam consoante a planta a enxertar (Rodrigues, 2009). No entanto as mais utilizadas são a enxertia de encosto-lateral e a enxertia de topo (aproximação), e de fenda-lateral e de topo (Mourão & Brito, 2014). No feijão-verde, a técnica aplicada é a enxertia por corte total (Rodrigues, 2009).

Em todos os tipos de enxertia, o objetivo é possibilitar o contato dos feixes vasculares de ambas as plantas, de forma a estabelecerem o transporte das seivas xilémica e floémica, entre a raiz e as folhas e vice-versa (Mourão & Brito, 2014).

Existem vários fatores que contribuem para o sucesso do processo de enxertia, antes e após a sua execução (Rodrigues, 2009). Quanto maior a afinidade botânica entre as espécies, maior o sucesso do enxerto (Teixeira, 2013). No que diz respeito à temperatura, esta deve manter-se entre os 24°C e os 27°C, nos 6 a 8 dias após o enxerto, a humidade relativa do ar, deve ser de 100% de forma a evitar a desidratação e a

iluminação deve ser controlada. É necessário a presença de oxigénio na união do enxerto, bem como elevadas condições de limpeza, higiene e desinfecção dos locais, utensílios, ferramentas e pessoas intervenientes (Rodrigues, 2009).

### **1.2.2. Vantagens e desvantagens da enxertia**

O principal objetivo da enxertia é obter resistência a doenças do solo, possibilitando o cultivo de hortícolas em áreas infetadas, evitando o contato da cultivar sensível com o agente patogéneo (Ferreira, 2015). No combate de patogéneos do solo, a enxertia é mais vantajosa do que a solarização do solo, utilização de vapor de água e pulverização com produtos químicos (Teixeira, 2013).

O porta-enxerto resistente mantém-se saudável assumindo as funções vitais de absorver água e nutrientes do solo, permitindo simultaneamente o desenvolvimento da cultivar comercial sensível ao agente patogéneo. A utilização de plantas enxertadas não exige mudanças significativas nas técnicas de produção da cultura, e o agricultor não precisa de recorrer à utilização de equipamentos adicionais (Ferreira, 2015). Outra vantagem referida por Rodrigues (2009) é que para além de induzir a resistência a doenças radiculares, também aumenta fortemente a capacidade produtiva da planta em ciclos de longa duração.

Na cultura do feijão, a enxertia tem sido utilizada como meio de proteção contra nematodes-das-galhas-radiculares (NGR) (*Meloidogyne* spp.) e fusariose vascular (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*) (Ferreira, 2015; Costa et al., 2016).

A dificuldade de obtenção de novas cultivares resistentes a NGR prende-se com a elevada plasticidade genética de NGR. Assim, sabe-se que a utilização de porta-enxertos tende a alterar as espécies dominantes de NGR no campo, que em vez de os eliminar, poderão selecionar espécies de NGR mais adaptadas a parasitar os porta-enxertos, criando novos desafios para a utilização desta técnica (Costa, 2014).

De acordo com o mesmo autor, a enxertia de hortícolas utilizando porta-enxertos parcialmente resistentes a NGR é uma ferramenta promissora no controlo destes nemátodes em diversos patossistemas. No entanto, a enxertia não permite por si só o controlo sustentável e duradouro de nemátodes fitoparasitas, e particularmente de NGR, pois apesar de induzir um novo equilíbrio na comunidade de nemátodes, com efeitos teoricamente antecipados na alteração da espécie de nemátodes dominante, a utilização

de porta-enxertos apenas parcialmente resistentes ou tolerantes, não permite a explosão das populações de NGR, mas, também não as elimina totalmente.

Outras vantagens da enxertia são a maior tolerância à salinidade e maior capacidade de absorção de água, proporcionando melhor qualidade dos frutos que perderam a cerosidade, tornando-se mais atraentes para o consumidor (Ferreira, 2015).

Fatores relacionados com o sucesso ou insucesso desta prática estão relacionados com vários fatores, em que é determinante o nível de compatibilidade/incompatibilidade entre o porta-enxerto e a cultivar enxertada, que podem influenciar a cicatrização do enxerto (Ferreira, 2015).

A realização da enxertia requer assim condições de higiene adequadas à prevenção de contaminação das plantas. Após a enxertia, é necessário manter condições de humidade e temperatura adequada à cicatrização (Mourão & Brito, 2014), na produção do tecido do calo (Ferreira, 2015), podendo cobrir-se as plantas, com um filme de plástico (Mourão & Brito, 2014).

Segundo Teixeira (2013), as vantagens da enxertia traduzem-se na capacidade de absorção mineral, o que se traduz em melhorias na capacidade de nutrição da planta; na resistência a doenças do solo, tais como *Fusarium*, *Verticilium*, “*Corky-Root*”; na tolerância ou resistência a nemátodes; na tolerância a altas e baixas temperaturas; na tolerância à salinidade; na tolerância a solos demasiados húmidos; no crescimento mais rápido e vigorosos da planta; e no aumento da qualidade e quantidade dos frutos, sem afetar a tipologia dos mesmos. O mesmo autor refere como desvantagens a baixa compatibilidade entre as plantas, que se traduz na falta de união entre a planta enxertada e o porta-enxerto, como resultado da diferença entre os diâmetros dos respetivos caules; desenvolvimento excessivo abaixo, acima ou no ponto de união; amarelecimento das folhas seguindo-se a desfoliação precoce; crescimento vegetativo reduzido; produção de frutos pequenos ou de má qualidade e morte prematura da planta.

### **1.3.Microrganismos no sistema solo-planta**

#### **1.3.1.Nemátodes**

Os Nemátodes constituem uma classe rica em espécies, com larga distribuição. Podem ser parasitas de plantas, do homem e de animais (Kukenthal et al., 1986) mas também podem viver como organismos livres (Coyne et al., 2007). São animais simples

contendo aproximadamente 1000 células, com um padrão invariável de divisões celulares durante o desenvolvimento (Castagnone-Sereno & Danchin, 2014). São vermes cilíndricos, algumas vezes filiformes, e muito adelgaçados nas extremidades (Kukenthal et al., 1986). São na maioria de pequenas dimensões, com menos de 1 cm de comprimento. O corpo é revestido por uma cutícula espessa e elástica, na maioria lisa, mas com frequência também anelada (Kukenthal et al., 1986).

O tubo digestivo permite distinguir três seções: primeiro o esófago, provido de uma forte musculatura radial e trabalhando à maneira de uma bomba, a seguir o intestino médio, que corre retilineamente para trás, e por fim o curto intestino terminal, igualmente de parede muscular. A boca, muitas vezes circundada de papilas ou “lábios”, encontra-se na extremidade anterior do corpo e o ânus está colocado ventralmente, perto da extremidade posterior (Kukenthal et al., 1986).

Em algumas espécies de vida livre, a faringe é usada para ingerir e esmagar bactérias; em parasitas de plantas, ela está conetada a um estilete especializado para perfurar os tecidos da raiz (Castagnone-Sereno & Danchin, 2014).

O sistema nervoso compõe-se de um anel em volta do esófago (constituído por células glanglionares e fibras nervosas) e de vários nervos e cordões longitudinais que estão situados na epiderme (Kukenthal et al., 1986). Não possui um sistema circulatório, e a respiração é cutânea (Kukenthal et al., 1986).

O sistema excretor dos nemátodes é único no reino animal. Consta de uma ou algumas células glandulares (glândulas ventrais) que estão situadas na parte ventral anterior do corpo na região da faringe e que desaguam ventro-medianas por um fino e curvo canal (Kukenthal et al., 1986).

Apresentam na sua maioria, sexos separados; o hermafroditismo é raro. O aparelho sexual apresenta uma configuração muito simples. Os ovos encerrados numa casca mais ou menos espessa, não incluem células vitelinas. A postura dos ovos faz-se antes ou durante a segmentação, ou já com as larvas desenvolvidas (Kukenthal et al., 1986).

O tamanho da comunidade de nemátodes, pode mudar temporariamente de tamanho ou desaparecer como resultado de fatores de stresse, como por exemplo a desidratação, alteração da proporção O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, ou mudanças de temperatura. Estas situações de stresse podem resultar numa maior concorrência e extinção de espécies. Pode ocorrer dispersão de nemátodes pelo vento, água e vetores bióticos para novos habitats de forma contínua (Bongers & Bongers, 1997).

Cerca de 4100 espécies de nemátodes parasitas de plantas foram descritos até hoje, sendo que o Nemátode-das-Galhas-Radiculares (NGR) está em primeiro lugar, no top 10, pela sua importância económica (Jones et al., 2013).

Todos os nemátodes parasitas de plantas alimentam-se a partir do citoplasma de células de plantas vivas. Esta capacidade terá surgido de uma transferência lateral de genes (TLG) de bactérias do solo. Uma possível explicação para este facto, diz respeito a um antepassado dos nemátodes, inicialmente bacterívoro, que se alimentava de bactérias do solo, incluindo as bactérias patogénicas de plantas. O material genético de bactérias digeridas poderia ter sido transferido para o genoma nuclear dos nemátodes, os indivíduos com enzimas adicionais adquiridas via TLG poderiam ter sido selecionados positivamente após várias gerações e, eventualmente, desenvolveram um estilo de vida de parasita de planta. Esta transferência poderá ter ocorrido por endossimbiose ou através um mecanismo diferente de alimentação (Danchin et al., 2012).

A maioria dos nemátodes parasitas de plantas são vermes semelhantes a fios com um comprimento entre 0,25 mm e 1,0 mm, embora alguns possam atingir 4,0 mm. Apesar do corpo da maioria afilar na direcção da cabeça e da cauda, há uma grande variabilidade na forma e tamanho. As fêmeas de algumas espécies, durante o desenvolvimento, perdem a aparência vermiforme e ficam com o corpo largo (Coyne et al., 2007).

Os nemátodes parasitas de plantas diferem dos nemátodes que se alimentam de bactérias e fungos por terem uma estrutura de alimentação especializada, o estilete. Este é usado para injetar enzimas nas células e tecidos vegetais e, a seguir, extrair os conteúdos, de um modo semelhante ao dos afídeos a alimentar-se nas plantas, podendo sobreviver a condições desfavoráveis, tais como uma estação seca ou um inverno frio (Coyne et al., 2007).

Segundo o mesmo autor, o ciclo de vida do nemátode é tipicamente dividido em seis estádios: o ovo, quatro estádios juvenis e o adulto. A duração de qualquer um destes estádios e do ciclo de vida completo difere consoante a espécie e também depende de fatores tais como temperatura, humidade e planta hospedeira.

Os nemátodes parasitas de plantas podem ser divididos em parasitas das partes aéreas – que se alimentam nas partes da planta acima do solo – e parasitas das raízes e tubérculos – que se alimentam nas partes abaixo do solo, podendo ser agrupados pela forma de parasitismo e mobilidade em três grupos principais: (Coyne et al., 2007).

- Endoparasitas migratórios – nemátodes móveis que se alimentam no interior dos tecidos radiculares.
- Endoparasitas sedentários – nemátodes que, quando encontram um local de alimentação no interior da planta, ficam imóveis e fixam-se num local para se alimentarem.
- Ectoparasitas – nemátodes que se alimentam no exterior da planta

No século passado, o mais eficiente método de eliminação dos nemátodes fitoparasitas era a aplicação de brometo de metilo, que funcionava como biocida. Pelos perigos inerentes à sua toxicidade e efeitos nocivos sobre a camada de ozono, foi banido da Europa no início do sec. XXI (Costa, 2014). Estes factos têm pressionado a comunidade científica a apresentar soluções viáveis para o problema.

Os nemátodes têm como inimigos naturais, o fungo endoparasita generalista *Catenaria* sp., a bactéria *Pasteuria penetrans*, o fungo *Pochonia chlamydosporia* e também os fungos micorrízicos (Costa, 2014). Os rizóbios poderão também ter uma função relevante na indução de defesa na planta contra NGR visto que os mecanismos que os NGR usam para comunicar com a planta, possibilitando a infeção das raízes e a indução das galhas, são semelhantes aos usados pelos rizóbios.

As consociações e as rotações de culturas bem como a fertilização orgânica poderão estar a contribuir para a manutenção de vários mecanismos de controlo de nemátodes fitoparasitas, uma vez que estes estão relacionados com a identidade das plantas que lhe são mais favoráveis (Costa, 2014).

### **1.3.1.1. Nemátodes-das-lesões-radiculares (*Pratylenchus* spp.)**

As espécies de nemátodes do género *Pratylenchus* são genericamente referidas como nemátodes das lesões radiculares, devido aos sintomas das lesões necróticas que causam nas raízes dos seus hospedeiros (Ribeiro, 2009). São considerados, o terceiro grupo de nemátodes de maior importância económica a nível mundial, uma vez que tem causado perdas extremamente preocupantes em várias culturas como a cana-de-açúcar, café, banana, milho, legumes, batata, muitos vegetais e árvores de fruto (Jones et al., 2013). A planta infetada com *Pratylenchus* sofre uma redução no crescimento da raiz, acompanhado com a formação de necroses, escurecimento e morte celular, seguindo-se um ataque secundário provocado por fungos e bactérias do solo. Estes danos provocam redução do crescimento da planta, aumentando o stresse hídrico e o seu amarelecimento.

A infecção pode afetar a raiz em comprimento, com danos na epiderme, endoderme e córtex da planta (Jones et al., 2013).

Das 60 espécies conhecidas, as mais importantes são *P. penetrans*, *P. thornei*, *P. neglectus*, *P. zaeae*, *P. coffeae* e *P. vulnus* (Jones, et al., 2013).

*Pratylenchus* é um nemátode endoparasita intercelular, polífago (Jones et al., 2013) migratório, que invade, multiplica-se, alimenta-se e move-se no córtex da raiz da planta hospedeira (Peña et al., 2005). O processo de alimentação envolve a escolha da célula, penetração do estilete, salivação e ingestão. As segregações das glândulas da faringe, são injetadas na célula e contem várias enzimas capazes de degradar a parede celular (Jones et al., 2013). Esta atividade leva à exaustão do conteúdo citoplasmático das células e resulta na formação de lesões necróticas, que aumentam de tamanho e escurecem devido à subsequente colonização por microrganismos oportunistas, promovendo infecções fúngicas (Ribeiro, 2009). Tal situação prejudica a absorção de nutrientes deixando as plantas empobrecidas, apresentando sintomas como amarelecimento, nanismo e sistema radicular reduzido. As plantas que se encontram em tal quadro apresentam, obviamente, produção reduzida, levando a prejuízos financeiros (Junior, 2009). Estes efeitos provocados pelo *Pratylenchus*, dependem da combinação de espécies de nemátodes e da densidade de nemátodes na rizosfera (Peña et al., 2005).

O ciclo de vida de *Pratylenchus* spp. dura 3 a 8 semanas, dependendo da espécie (Jones et al., 2013) e das condições do ambiente (temperatura e humidade principalmente) (Ribeiro, 2009). Inicia-se com o ovo, onde ocorrem multiplicações celulares, o desenvolvimento embrionário e a formação do primeiro estágio juvenil (J1). Este sofre a primeira muda e passa ao segundo estágio (J2). O J2 eclode do ovo, migra pelo solo e pode parasitar o hospedeiro, sofre mais 3 mudas sem interromper o processo de alimentação, passando a J3, J4 e adulto (Ribeiro, 2009). Tanto os adultos como os juvenis são móveis, podendo entrar e sair da raiz (Jones et al., 2013). A fêmea de *Pratylenchus* pode depositar os seus ovos tanto no interior das raízes de uma planta atacada (Ribeiro, 2009), como no solo adjacente à raiz (Jones et al., 2013). Assim que o J2 eclode pode iniciar imediatamente o parasitismo. Juvenis e adultos são considerados infetantes em todos os estádios do ciclo de vida (Ribeiro, 2009). Os machos são frequentes numa espécie e ausentes noutras, apesar da reprodução ser por partenogénese (Jones et al., 2013).

A textura do solo é um dos principais fatores que influenciam a distribuição de espécies de *Pratylenchus*. Sendo a humidade do solo necessária para muitos processos

vitais dos *Pratylenchus*, apresentando como condição óptima valores de teor de água no solo na faixa de 70 a 80% da capacidade de campo (Ribeiro, 2009).

### **1.3.1.2. Nemátodes-das-galhas-radiculares (*Meloidogyne* spp.)**

Os nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR) pertencem ao género *Meloidogyne* (Castagnone-Sereno et al., 2013), género composto por 98 espécies. As espécies consideradas as mais importantes são *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. hapla* (Jones et al. 2013). São endoparasitas (Castagnone-Sereno et al., 2013) obrigatórios de plantas vasculares (Jones et al. 2013) e apresentam uma grande distribuição mundial podendo ser encontrados em diversos ecossistemas, desde solos congelados até florestas tropicais (Castagnone-Sereno & Danchin, 2014).

O seu nome vulgar - nemátodes-das-galhas-radiculares- deve-se aos sintomas que causa nas raízes das plantas que parasitam, originando estruturas que lembram “nós” (Jones et al. 2013), e tem origem grega que significa “fêmea em forma de maçã” (Mitkowski & Abawi, 2003).

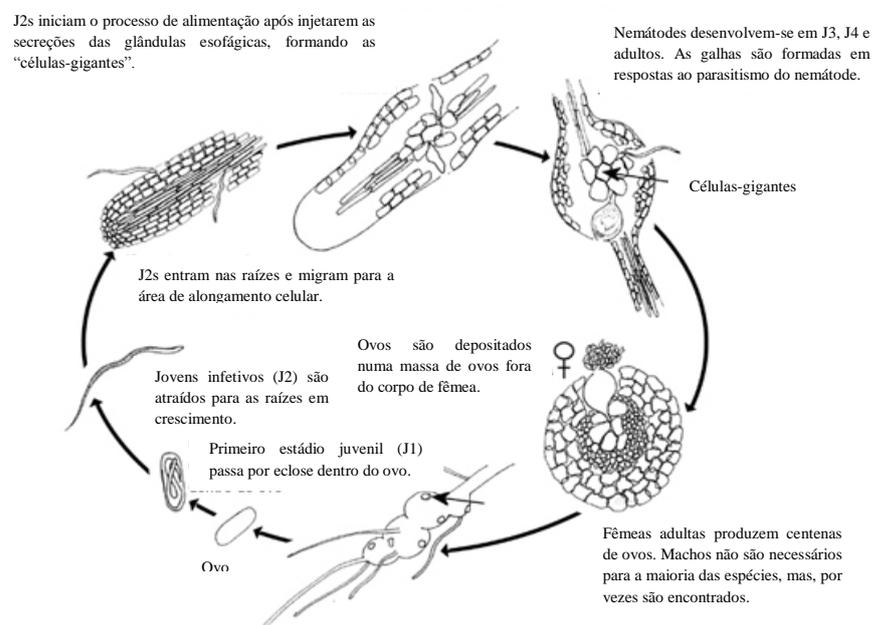
Os NGR conseguem manter uma relação trófica com o seu hospedeiro por várias semanas e induzem a diferenciação das células da raiz, em células especializadas para a sua alimentação (Jaouannet et al., 2012), infetando mais de 5500 espécies de plantas (Jaouannet et al., 2012) e causando danos em culturas em todo o mundo, principalmente em regiões mais quentes. Nestas condições, para além de serem produzidas um maior número de culturas susceptíveis, as temperaturas mais elevadas permitem que ocorrem mais gerações de nemátodes (Mai, 1985).

As plantas afetadas apresentam sintomas na parte aérea e na parte inferior. Os sintomas externos causados por NGR são murchidão e nanismo, implicando deficiência nutricional da planta e redução de produção devido à limitada capacidade de absorção e transporte de água e nutrientes. Nas raízes, o sintoma característico da infeção por NGR, é a presença de galhas (Mitkowski & Abawi, 2003).

O NGR apresenta uma grande variedade de estratégias reprodutivas, que vão desde a reprodução sexual obrigatória à partenogénese mitótica (Castagnone-Sereno et al., 2013). A maioria dos nemátodes das galhas reproduzem-se por partenogénese onde as fêmeas produzem clones de si próprias (Costa, 2014), apenas algumas espécies se reproduzem por reprodução sexuada, com a fusão obrigatória de gametas (Abad et al. 2009). Os machos podem ser encontrados em espécies partenogénicas quando as

condições são desfavoráveis para o desenvolvimento de fêmeas, tal como quando a densidade populacional é elevada e, existe limitação de alimento (Moens et al, 2009). A partenogênese abranda a coevolução, e ajuda a conservar alguns componentes importantes (Trudgill & Blok, 2001), como a adaptação do nemátode a qualquer ambiente, que permite aumentar a gama de hospedeiros, e ainda quebrar a resistência da planta hospedeira ao seu ataque (Costa, 2014).

O ciclo de vida dos NGR (Figura 1.3.1.2.) completa-se em seis semanas dependendo da espécie e das condições ambientais, e compreende quatro fases juvenis, além da fase adulta. Entre estas fases ocorrem mudas, durante as quais a cutícula é substituída (Castagnone-Sereno et al., 2013).



**Figura 1.3.1.2. Ciclo de vida do nemátode das galhas radiculares (adaptado de Mitkowski & Abawi, 2003).**

Após a embriogênese, o juvenil (J1) evolui dentro do ovo (Jones, 2013), para a fase infecciosa (J2) que eclode. A eclosão de J2 é essencialmente dependente da temperatura e humidade, embora outros fatores possam interferir (Moens et al, 2009), e por vezes permanecem no ovo, hibernando (Eisenback, 1985). Nesta fase do ciclo de vida (J2), o nemátode apresenta um comprimento não superior a 500 µm e largura de 15 µm (Mitkowski & Abawi, 2003). Devido a adaptações fisiológicas e bioquímicas, incluindo a diapausa, e reservas lipídicas que prolongam a viabilidade de J2 até invadir um hospedeiro (Moens et al, 2009), os nemátodes são bastante resistentes a condições

adversas, sendo capazes de se manter no solo por muitos dias (Costa, 2014). Os juvenis de segundo estágio são móveis no início, vermiformes, e o seu sistema reprodutor é minúsculo, mas começa a desenvolver-se assim que se torna sedentário, parasita e inicia a alimentação (Eisenback, 1985). Os juvenis de segundo estágio são atraídos pelas plantas em resposta a estímulos químicos libertados a partir das raízes, e que são recebidos pelo seu órgão sensorial cefálico, podendo migrar a longas distâncias até 25 cm na vertical, em 10 dias (Hussey, 1985). Os nemátodes podem ser atraídos por outros estímulos, como o calor metabólico da raiz, a quantidade de CO<sub>2</sub>, substâncias aleloquímicas, feromonas libertadas pelos J2 no local de invasão (Curtis et al., 2009), pelos meristemas apicais da raiz, e lesões nas raízes. J2 invadem a raiz na zona de alongamento (Castagnone-Sereno et al., 2013), e com a ajuda do seu estilete destroem a parede celular utilizando enzimas (Jones et al., 2013).

Após a invasão, deslocam-se de forma intracelular em direção à ponta da raiz, não causando nenhum dano evidente, e uma vez atingido o meristema da raiz, migram para o cilindro vascular diferenciado (Castagnone-Sereno et al., 2013). Ao longo desta deslocação as células sofrem distensão e compressão (Hussey, 1985). Na zona de desenvolvimento do protoxilema (Castagnone-Sereno et al., 2013), sintetizam efetores, nas glândulas esofágicas e injetam-nos no tecido da planta através do estilete, que modificam a parede da célula, (Jaouannet et al., 2012). No interior do cilindro vascular J2 infeta uma série de três a oito células gigantes, onde se alimenta de 3-8 semanas, aumentando significativamente de tamanho (Eisenback & Hunt, 2009), e injetando proteínas nas células vegetais, que manipulam as funções nucleares da célula hospedeira e contribuem para a supressão das defesas da planta durante a infecção (Jaouannet et al., 2012). Nesse local, os juvenis J2 passam por três mudas até se transformarem em adultos (Castagnone-Sereno et al., 2013) alimentando-se da planta e causando a perda da eficiência funcional da raiz na absorção de água e nutrientes (Costa, 2014).

As fêmeas juvenis necessitam de grandes quantidades de nutrientes para a produção de ovos e para competirem com a planta por nutrientes. Esta extração de nutrientes aumenta muito na altura da postura de ovos diminuindo no final (Hussey, 1985). O ciclo termina com a postura de 300 a 500 ovos, pela fêmea, numa matriz gelatinosa à superfície da raiz (massa de ovos) (Costa, 2014).

As massas de ovos são compostas por glicoproteína, que é produzida pelas glândulas retais. Esta massa mantém os ovos juntos e protege-os contra as condições ambientais extremas e predação. É inicialmente macia, pegajosa e hialina mas torna-se

mais firme e castanha escura com a idade. A matriz tem propriedades antimicrobianas (Moens et al, 2009).

Os ovos de *Meloidogyne* só conseguem persistir no solo, durante um ano, as massas de ovos podem ter cor branca ou castanha de acordo com o grau de stresse ambiental. As massas de ovos, brancas são geralmente formadas no início do ciclo de crescimento e os ovos eclodem cedo para garantir mais do que uma geração por ciclo de crescimento. À medida que a estação do ano progride e / ou ocorrem algumas alterações ambiental, são formadas massas de ovos castanhas. Estas massas de ovos têm uma dormência (diapausa) e não evoluem de imediato e ocorrem nas quatro maiores espécies de *Meloidogyne*. Esta estratégia, de desenvolvimento de dois tipos de massas de ovos (branco e castanha) assegura que pelo menos alguns ovos não eclodam de imediato, o que permite que haja um intervalo de tempo entre uma eclosão e a seguinte (Gundy,1985).

Os ovos dos NGR variam em tamanho e forma mas tem tipicamente cerca de 95 µm de comprimento e 40 mm de diâmetro (Eisenback & Hunt, 2009). O ovo de *Meloidogyne* spp. é cilíndrico com três camadas e a casca possui quitina (Curtis et al., 2009).

A temperatura é o principal fator que interfere no desenvolvimento embrionário dos ovos. A temperatura óptima para a embriogénese situa-se entre 25°C e 30°C e a percentagem de humidade do solo ideal para os nemátodes situa-se entre os 40 e os 60 % de capacidade de campo (Gundy,1985). A eclosão de *Meloidogyne* ocorre quando há condições ambientais, cada fêmea pode colocar 30-40 ovos por dia, se a postura é feita à superfície da raiz, as camadas exteriores na matriz gelatinosa pode tornar-se secas, o que resulta no seu endurecimento, exercendo pressão mecânica sobre os ovos para inibir a incubação dos J2 durante condições de dessecação (Curtis et al., 2009). É nesta fase que J2 que modifica a estrutura da casca do ovo antes da eclosão, a saída do ovo ocorre sem a necessidade de sinais específicos da raiz hospedeira. No entanto, em certos casos, os exsudatos da raiz, podem afetar o número de J2 que saem por unidade de tempo e ativar a incubação em algumas espécies de *Meloidogyne* (Curtis et al., 2009). A maioria das espécies tem múltiplas gerações durante uma estação de crescimento, verificando-se que nas fêmeas mais velhas ou mal nutridas, as últimas gerações de J2 não evoluem, permanecendo protegidos no ovo e matriz gelatinosa durante o período entre culturas (Curtis et al., 2009).

Os estádios J3 e J4 não se alimentam devido à falta de um estilete funcional, os machos são vermiformes e abandonam a raiz. (Jones et al, 2013) enquanto que as fêmeas ficam fixas durante toda a sua vida, no local de alimentação (Coyne et al, 2007). À medida que se desenvolvem, o corpo vai alargando até ficar com uma forma esférica, de limão, de rim ou ovóide (Coyne et al, 2007), induzindo a formação de galhas, estruturas globosas na raiz (Costa, 2014). Nesta altura o seu comprimento pode ser de 400 a 1000 µm (Mitkowski & Abawi, 2003).

A fêmea embora sedentária, possui músculos que lhe permite mudar a cabeça de posição para que se possa alimentar das várias células gigantes (Eisenback & Hunt, 2009). No solo os machos adultos migram e tentam encontrar uma fêmea para reprodução sexual (Eisenback & Hunt, 2009). As glândulas da faringe do sexo masculino são degeneradas, enquanto que o intestino serve como um órgão de armazenamento para as reservas de alimentos obtidas no estádio J2 e fornecem energia para o sistema reprodutor na produção de esperma (Eisenback & Hunt, 2009).

As galhas são compostas por uma massa gelatinosa clara, sólida, por vezes dura, que têm origem no interior da raiz e a sua remoção é difícil e danifica o córtex radicular (Coyne et al., 2007). As galhas podem variar consideravelmente, dependendo da espécie de nemátode, da cultura e cultivar, e se ocorrem em raízes ou em tubérculos. Segundo os mesmos autores, o aspecto típico inclui:

- Pequenos intumescimentos individuais semelhantes a contas
- Grupos maciços de tecido carnudo
- Extremidade das raízes com intumescimentos
- Intumescimentos irregulares ao longo da raiz
- Extremidades das raízes em forma de gancho
- Intumescimento na raiz pouco visível, apenas visível uma pequena saliência na raiz onde se encontra o nematode.

As galhas induzida por *M. hapla* são geralmente menores (Hussey, 1985) enquanto que *M. javanica* e *M. incognita* tendem a formar grandes e irregulares galhas a alguma distância a partir da zona terminal da raiz (Hunt & Handoo, 2009).

### **1.3.1.3. Sintomas e estragos nas culturas**

Os nemátodes fitoparasitas causam mundialmente danos avultados em sistemas agrícolas (Costa, 2014), gerando um grande impacto na fisiologia e no crescimento da

planta (Ribeiro, 2009), reduzindo a quantidade e a qualidade da produção e predispondo as plantas ao ataque de outros agentes patogêneos (Costa, 2014). A magnitude dos sintomas provocados nas plantas é variável e complexa (Ribeiro, 2009) podendo ser observados na parte aérea e na parte subterrânea. Os sintomas das partes aéreas podem dividir-se em duas categorias: os que são provocados por nemátodes da parte aérea que atacam as folhas, e os que são provocados por nemátodes das raízes, que atacam as raízes das plantas (Coyne et al, 2007). Os nemátodes das raízes quase sempre causam vários graus de crescimento anormal das partes subterrâneas, mas estes sintomas, por si só, geralmente não são suficientes para diagnosticar um problema de nemátodes nas raízes. Segundo o mesmo autor a maioria dos sintomas refletem ou podem ser confundidos com outros problemas, como falta de água ou absorção anormal de minerais, incluindo:

- Clorose (amarelecimento) ou outra coloração anormal da folhagem
- Crescimento irregular e reduzido
- Folhagem fina ou escassa
- Sintomas de stresse hídrico, tais como emurchecimento ou enrolamento da folha
- Definhamento de plantas perenes ou lenhosas com pouca ou sem nova folhagem
- Tamanho reduzido dos frutos e das sementes
- Baixas produções.

Outros sintomas que podem sugerir uma infecção por nemátodes das raízes são:

- Falta de reação normal da planta à adição de fertilizantes
- Tendência a reagir mais rapidamente ao stresse hídrico do que as plantas saudáveis e recuperação lenta do emurchecimento
- Pouco ou nenhum desenvolvimento de folhas novas no início de uma nova época de crescimento
- Aumento de infestantes (grande densidade), devido ao facto das plantas infetadas com nemátodes serem menos capazes de competir com as infestantes não infetadas
- Incidência maior da doença devido à falta de resistência das plantas infetadas com nemátodes.

Os sintomas das partes subterrâneas são devidos aos nemátodes das raízes e podem ser suficientemente específicos para permitir o diagnóstico de um problema causado por nemátodes das raízes. Os sintomas incluem:

- Galhas nas raízes
- Raízes curtas, grossas ou reduzidas
- Lesões nas raízes
- Necrose, apodrecimento ou morte de raízes ou tubérculos
- Fendas nas raízes ou tubérculos
- Quistos nas raízes ou ‘raízes em rosário’
- Deformações nas raízes
- Arquitetura da raiz alterada

Segundo (Ribeiro, 2009) os danos causados por *Pratylenchus* nas raízes da planta hospedeiras são devido à associação de três tipos de ação: (i) mecânica – decorrente da migração típica realizado pelo nematóde no interior do córtex radicular; (ii) destruição de grande número de células mesmo sem se alimentar delas; (iii) espoliativa – representada pela remoção do conteúdo citoplasmático e toxinas, resultante da injeção de secreções esofágicas produzidas pelo nematóde no citoplasma das células (Ribeiro, 2009). Durante a infecção os nemátodes removem nutrientes, da planta durante a alimentação e afetam a absorção de água e nutrientes bem como o transporte desses até à parte aérea da planta, retardando o seu crescimento. Tal facto pode afetar direta o indiretamente os processos fisiológicos da planta hospedeira, incluindo a respiração, a fotossíntese, a absorção e o transporte, a relação hídrica e o equilíbrio hormonal, entre outros. No que diz respeito à fotossíntese, a infecção das raízes, compromete a capacidade fotossintética das folhas, principalmente em plantas jovens. Quanto à absorção e transporte em plantas infetadas por nemátodes, a quantidade transportada é reduzida, variando de forma temporal e espacial, dependendo da espécie de nemátodes e do hospedeiro envolvido. Desta forma, os nemátodes que parasitam as células do cilindro vascular parecem ser os que possuem maior efeito na nutrição da planta e na relação hídrica, uma vez que provocam a interrupção na continuidade dos elementos vasculares, ao induzir o desenvolvimento anormal dos mesmos (Ribeiro, 2009).

Os danos visíveis nas plantas infetadas por NGR são semelhantes aos produzidos em todas as plantas que têm sistema radicular danificado. O crescimento de rebentos pode ser suprimido; a nível nutricional a planta mostra deficiências na folhagem, particularmente clorose; murchidão temporária durante períodos de stresse hídrico moderado, quando as temperaturas são altas, apesar da adequada humidade do solo, e redução do rendimento das culturas (Hussey, 1985). A magnitude destes sintomas está muitas vezes relacionada com o número de juvenis que penetram e se estabelecem dentro do tecido da raiz da planta. Os fatores do meio ambiente também influenciam, induzindo stresse nas plantas, como por exemplo, a seca ou temperaturas extremas, que aumentam os danos nas plantas infetadas.

No feijoeiro os nemátodes *Meloidogyne* spp. podem provocar murchidão de plantas que se mantêm mesmo depois de regadas e induzem a formação de galhas nas raízes (tecidos hipertrofiados). Na cultura em produção podem-se observar zonas do campo /estufa sem plantas ou com plantas pouco desenvolvidas no meio de plantas vigorosas (Marques et al., 2002).

Como meios de proteção culturais, na cultura do feijoeiro devem ser feitas rotações de culturas; destruídas as infestantes; fazer a solarização do solo; evitar transportar terra infestada de um campo para outro (Marques et al., 2002) e destruir as galhas (Onkendi, 2012). No que diz respeito à proteção biológica têm sido utilizados fungos, nemátodes (Marques et al., 2002), bactérias antagonistas e extratos de calêndula.

### **1.3.2. Bactérias fixadoras de azoto**

#### **1.3.2.1. Importância do azoto na produção vegetal**

O azoto é um nutriente requerido em grande quantidade para o crescimento das plantas, influenciando o crescimento das folhas e, conseqüentemente, a disponibilidade de hidratos de carbono disponíveis para o crescimento, a taxa fotossintética por unidade de área da folha, bem como o número e tamanho de órgãos de armazenamento (Veríssimo, 2008). No caso do feijoeiro, o azoto é importante no rendimento do grão (Oliveira, 2016).

O azoto atmosférico ( $N_2$ ) encontra-se numa forma indisponível, dado que a ligação tripla entre os 2 átomos de azoto assegura a esta molécula uma enorme

estabilidade. Apenas um pequeno grupo de seres procariontes é capaz de levar a cabo a fixação biológica do azoto, convertendo-o numa forma passível de ser assimilada biologicamente ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ). No solo, o azoto encontra-se principalmente na forma orgânica, nos resíduos vegetais e na biomassa (Silva, 2009). O azoto inorgânico pode ser fornecido através da decomposição da matéria orgânica, fertilizantes ou pelo processo da fixação biológica do azoto atmosférico (FBA) (Hungria & Araújo, 1994), sendo a sua absorção a partir do solo efetuada maioritariamente sob a forma de amónio e nitrato (Veríssimo, 2008). O azoto é um nutriente muito instável no solo, podendo ser perdido de várias formas, absorvido e exportado pela maioria das culturas anuais (Oliveira, 2016). Devido ao facto do feijoeiro absorver grandes quantidades de azoto, a fixação biológica de azoto pode substituir, a adubação mineral, particularmente importante no modo de produção biológico, visando o aumento da produtividade e aliado à redução dos custos de produção e à preservação do ambiente agrícola (Oliveira, Fabaceae ou Leguminosae 2016).

Segundo Fernandes & Rodrigues (2014) com a fixação biológica de azoto, utilizam-se menos adubos azotados, reduzem-se os custos de produção e minimizam-se os impactos negativos do azoto sobre o meio ambiente. Adicionalmente, as leguminosas utilizadas como adubos verdes (siderações), melhoram sendo eficientes na FBA disponibilizam azoto para a cultura seguinte e as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, aumentando a produtividade das culturas, especialmente evidente em solos pobres neste nutriente. A fixação biológica do azoto (FBA) é um processo em que as bactérias reduzem o  $\text{N}_2$  inerte a  $\text{NH}_3$ , biologicamente útil. A interação simbiótica entre rizóbios e leguminosas () é importante tanto em ecossistemas naturais como em ecossistemas agrícolas e merece grande atenção pela importância que tem no modo de produção biológico.

No ciclo do azoto, o fornecimento, utilização e perdas de N, através do qual um átomo de N passa do estado orgânico ao inorgânico e vice-versa, decorre numa sequência de processos que implicam a participação de bactérias e transformações químicas (Veríssimo, 2008).

### **1.3.2.2. O género *Rhizobium***

Em 1888, Beijerinck usou o nome de *Bacillus radicola* para designar bactérias isoladas de nódulos de diferentes legumes. Em 1889, Frank (1898) designou estas

bactérias como *Rhizobium* e a espécie tipo do género como *R. leguminosarum*. *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, e *R. japonicum* foram subdivididas num critério baseado, principalmente, nos grupos de inoculação cruzada entre o microssimbionte e a planta hospedeira (Fred et al., 1932). Outras características fisiológicas, bioquímicas e genéticas, além da inoculação cruzada e taxa de crescimento lento e produção de metabolitos alcalinos ou ácido *in vitro*, passaram a ser considerados na classificação destas bactérias nas décadas subsequentes, e permitiram a divisão de *Rhizobium* em dois grupos, de crescimento rápido e de crescimento lento (Lohis & Hansen, 1921). As bactérias, porém, continuaram a ser classificadas no género *Rhizobium* (Buchanan, 1980) da família Rhizobiaceae. Em 1980, estavam descritas apenas seis espécies do género *Rhizobium*, e este número aumentou para 10 até o ano de 2000. Com base nos hospedeiros que infetam, e nas diferenças morfológicas e fisiológicas, estas bactérias foram reclassificadas e vários géneros e novas espécies foram descritas posteriormente. Até 2011 o número de géneros de rizóbios aumentou para 17, e cinco géneros *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Agrobacterium*, *Ensifer* (syn. *Sinorhizobium*), e *Shinella* foram incluídos na família Rhizobiaceae, ordem Rhizobiales da classe Alphaproteobacteria (Okazaki et al., 2004). *Agrobacterium*, um grupo de bactérias maioritariamente fitopatogénicas, foi colocado no grupo das bactérias benéficas fixadoras de azoto (rizóbio) na família Rhizobiaceae, o que causou vários problemas taxonómicos em relação a esta família (Seyed, 2016). Apesar dos novos géneros descritos para rizóbios, em 2013 o género *Rhizobium* incluía cerca de 40% das espécies de rizóbios (Lindström et al., 2015). Este é um género heterogéneo abrangendo dois grandes subgrupos: o "Complexo de espécies *R. leguminosarum*" e "Grupo *R. tropici*" (Ribeiro et al, 2012). Apesar de em 2014 o género *Rhizobium* incluir 56 espécies, alguns autores não consideram este género adequado para todas as espécies que o integram, uma vez que alguns deles surgem filogeneticamente intercaladas com os membros de outros géneros de Rhizobiaceae (Young et al., 2001). Segundo Seyed (2016), as principais razões que criam conflitos e heterogeneidade na designação de *Rhizobium* podem ser listados como: (i) o grande número de novas espécies de rizóbios descritas; (ii) tendência a usar o termo "*Rhizobium*" para praticamente todas as novas bactérias fixadoras de azoto; e (iii) a confusão devido à fusão dos géneros *Agrobacterium* e *Allorhizobium* em *Rhizobium*.

A designação genérica atribuída a este vasto grupo de bactérias que fixam o azoto atmosférico através de simbioses com leguminosas é rizóbio, atualmente

distribuídos nas classes Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria do filo Proteobacteria (Garrity et al., 2005; Sprent, 2008).

As bactérias do género *Rhizobium* são bastonetes com 0,5µm a 0,9 µm por 1,2 µm a 3,0 µm, são Gram negativas, aeróbias e movem-se através de flagelos. A temperatura adequada para o seu crescimento oscila entre os 25°C e os 30°C e o pH entre 6 e 7.

No que se refere às características fisiológicas, bioquímicas e genéticas podemos dividir o *Rhizobium* em dois grupos, o de crescimento rápido e o de crescimento lento (Lohis and Hansen, 1921). Estes dois grupos podem crescer nos meios de cultura EM ou YM, (extrato de levedura-manitol), com ou sem ágar, onde a fonte de carbono pode ser o glicerol ou o manitol. São capazes de metabolizar fontes de azoto inorgânicas e orgânicas, podendo o azoto ser fornecido na forma de sais de amónio, nitritos, nitratos e aminoácidos. A pureza da cultura verifica-se através da repicagem na superfície dos meios sólidos, de modo a obter colónias isoladas, podendo o meio de cultura YMA conter vermelho-congo ou azul de bromotimol como indicador (Hungria, 1994).

As colónias de rizóbios apresentam cor branca, são mucóides e brilhantes, podendo absorver o corante com a idade. No meio com vermelho-congo, as colónias podem apresentar tonalidade branca, rosa e fortemente rosa e os contaminantes apresentam-se fortemente corados. As colónias incubadas à luz, ou expostas à luz durante uma hora ou mais após ter ocorrido crescimento, absorvem o vermelho-congo. No caso de culturas muito velhas de rizóbios que acidificam o meio, pode haver uma mudança na coloração do meio, que passa a violeta devido à acidez. Alguns rizóbios podem produzir colónias rosadas ou amarelas, mas são incomuns. Em meio sólido, as colónias de rizóbio são, geralmente, redondas, variando de achatadas a cónicas, ou até em forma de cúpula. As margens das colónias são normalmente lisas. Quando as colónias crescem sob a superfície do meio elas adquirem a forma característica de lentes biconvexas (Araújo, 1994).

A cor rósea é evidente em nódulos nos estádios iniciais da fixação do N<sub>2</sub>, acentuando-se nos estádios seguintes (Hungria & Araújo, 1994).

Quanto à reação de indicadores de pH adicionados ao meio de cultura os rizóbios podem ser divididos em três classes: estirpes que acidificam o meio, estirpes que alcalinizam o meio, e estirpes que não alteram o pH do meio de cultura. As placas do meio YM com azul de bromotimol, recém-preparadas, têm um pH aproximadamente de 6,8 e cor verde. Os rizóbios de crescimento lento tendem a alcalinizar o meio de

cultura, causando uma mudança na cor do indicador, para azul. Os rizóbios de crescimento rápido costumam apresentar reação ácida, tornando o meio de cultura amarelo. O tempo necessário para as colónias atingirem o seu desenvolvimento máximo, em placas, varia de 3 a 5 dias para estirpes de crescimento rápido (4-5mm) até 7 a 12 dias no caso das estirpes de crescimento mais lento (1-4mm). Os rizóbios de metabolismo neutro não modificarão o meio. A velocidade de crescimento varia com a temperatura de incubação, a origem do inóculo (espécie cultivada ou nódulo) e a composição do meio. Algumas estirpes de rizóbios, sobretudo as de crescimento rápido, apresentam colónias com aspeto bastante gomoso (mucóide), principalmente em placas com meio de cultura rico em carbono (ex: YM). Esse aspeto gomoso deve-se à produção de exopolissacarídeos, polímeros de glicose e outras hexoses que compõem as cápsulas das bactérias (Araújo, 1994).

### **1.3.2.3. Fixação biológica de azoto**

Apesar do azoto molecular ( $N_2$ ) predominar na composição da atmosfera este não pode ser utilizado pelas plantas. Por isso, a redução do azoto molecular é considerada a principal reação do ciclo biogeoquímico do azoto (Barney et al., 2006).

As bactérias da família Rhizobiaceae formam estruturas altamente específicas, os nódulos, onde ocorre a conversão do  $N_2$  atmosférico em amónia (Lindström & Mousavi 2010), que é incorporada em diversas formas de N orgânico para a utilização por algumas plantas da família Leguminosae, como o feijão. Essas bactérias conseguem quebrar a tripla ligação pela ação de um complexo enzimático, denominado dinitrogenase e o processo é denominado de fixação biológica do  $N_2$  (Araújo & Hungria, 1994). A amónia formada pela fixação é assimilada e transformada em amidas, antes de ser transportada pelo xilema para as partes da planta, onde vão ser sintetizadas as proteínas (Veríssimo, 2008). Neste processo planta e bactéria beneficiam desta interação (Zook, 2015).

Nos nódulos, as bactérias fixam azoto atmosférico ( $N_2$ ) e convertem-no em  $NH_3$ , assimilável pelas plantas de feijoeiro (Brito et al, 2015). Poderão também ter uma função relevante na indução de defesas na planta contra NGR (Costa, 2014).

Na fixação biológica do azoto (Quadro 1.3.2.3) o processo inicia-se pela interação entre a planta hospedeira e Rizóbio, pela libertação de certos compostos pelas células da raiz, que estimulam a multiplicação das células bacterianas na rizosfera.

São exsudados, diversos compostos pela planta hospedeira, como aminoácidos, açúcares, ácidos carboxílicos, homoserina e flavonóides, que agem como substância quimiotáctica atraindo o rizóbio, cuja população pode aumentar cem vezes. A adesão do rizóbio ocorre em sítios específicos, posteriormente, outras células aderem às bactérias que já estão presas aos pêlos radiculares. Esta adesão das bactérias pode ser condicionada pela idade da cultura, pré-tratamentos das células e composição do meio (Araújo & Hungria, 1994). Outros compostos funcionam como mediadores de reconhecimento entre a planta e as bactérias, uma vez que uma determinada estirpe de rizóbio pode infectar apenas certas espécies de plantas leguminosas.

No processo de invasão bacteriana o rizóbio penetra nas raízes das leguminosas através dos pêlos radiculares e atingem as células corticais, provocando o enrolamento do pelo radicular culminando na formação de um nódulo que se tornara activo para a fixação de N (Veríssimo, 2008). Antes da formação do nódulo ocorre o estímulo do rizóbio, ativação dos genes da nodulação, adesão da bactéria a determinados sítios na superfície das raízes e troca de sinais moleculares entre o hospedeiro e o microssimbionte, levando a alterações fenotípicas nas raízes.

O desenvolvimento do nódulo é um processo caracterizado por uma interação/regulação muito complexa de grupos de genes da planta hospedeira e da bactéria que ocorre em várias etapas, envolvendo mudanças fisiológicas e morfológicas tanto na célula hospedeira como na bactéria. As mudanças na bactéria visam, receber, o poder redutor das fontes de carbono da planta hospedeira, para promover o ATP necessário para o processo de fixação biológico. O primeiro produto da fixação do  $N_2$  é a amónia, que é transferida da bactéria para planta hospedeira. As reações de assimilação são então mediadas por enzimas que são desenvolvidas durante o estabelecimento da nodulação (Araújo e Hungria, 1994).

As mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amónia produzida pelas bactérias. No processo de fixação biológica do N estão envolvidos dois conjuntos de genes, *nod* e *nif*. Os genes *nod* genes são encontrados em *Rhizobium* enquanto, os genes *nif* podem ser encontrados também noutras bactérias (Haukka et al, 1998). Um grande número de genes de nodulação (Nod) codificam fatores Nod, que são moléculas sinal chave, que desempenham um papel crucial na etapa inicial de desenvolvimento dos nódulos e invasão bacteriana, na maioria das simbioses (D’Haeze & Holsters 2002).

Para que esta associação (leguminosa/rizóbio) seja eficaz, é necessário que ambas as espécies sejam compatíveis (Araújo & Hungria, 1994), caso contrário os

nódulos nas raízes não se desenvolvem, ou mesmo que se desenvolvam a eficácia da fixação biológica é nula. Para além destas condições, é necessário cobalto, para que se inicie a nodulação, boro para o crescimento e desenvolvimento dos nódulos, molibdénio e ferro para o funcionamento do nódulo, uma vez que entram na constituição da enzima nitrogenase (Veríssimo, 2008).

O azoto (N<sub>2</sub>) fixado pela leguminosa é uma fonte renovável e de grande importância para a agricultura. No entanto, a fixação simbiótica de azoto é limitada por vários stresses ambientais que, sendo ultrapassados, melhorariam a fixação de azoto nos agroecossistemas. As diferenças genéticas na tolerância a stresses ambientais são conhecidas tanto em plantas hospedeiras como em estirpes de rizóbio e, atualmente, os modelos informáticos baseados em vias metabólicas estão a fornecer uma análise mais profunda para explorar as relações genótipo/ fenótipo na fixação simbiótica de azoto.

**Quadro 1.3.2.3. Estádios para a formação dos nódulos e fenótipos causados nas raízes (Araújo & Hungria, 1994).**

- 
- Quimiotaxia
  - Multiplicação do rizóbio na rizosfera, colonização
  - Adesão do rizóbio às raízes da planta hospedeira
  - Troca de sinais moleculares entre a planta hospedeira e as bactérias
  - Alteração nos fenótipos radiculares, com a formação de raízes curtas e grossas, encurvamento dos pêlos radiculares, pêlos radiculares deformados, aumento do número de pêlos radiculares
  - Penetração da bactéria
  - Crescimento do cordão de infeção
  - Início de formação e desenvolvimento dos nódulos
  - Libertação das bactérias
  - Diferenciação das bactérias
  - Desenvolvimento da nitrogenase, leghemoglobina e enzimas relacionadas com a fixação do N<sub>2</sub>
  - Manutenção do tecido bacteroidal, função e persistência do nódulo
- 

O feijão nodulado é extramente sensível ao stresse, como alta temperatura e baixo pH do solo, associado ou não a níveis tóxicos de Al<sup>3+</sup>, fica desta forma a sobrevivência dos rizóbios comprometida (Araújo & Hungria, 1994).

A presença ou ausência de azoto afeta a simbiose, sendo que, em excesso o N mineral pode causar uma diminuição da eficiência simbiótica, porém quando aplicado em pequenas quantidades na cultura do feijão, permite um aumento no crescimento dos nódulos e maior fixação de azoto. Os teores muito baixos de azoto no solo podem ser

limitantes à atividade simbiótica (Ferreira et al., 2002) e na produtividade das plantas (Lopes et al, 2016).

No feijão, a fixação do azoto é baixa durante as duas primeiras semanas após a instalação da cultura, ocorrendo depois um pico na floração com subsequente queda acentuada. Os valores mais elevados da fixação de azoto pelo feijoeiro em simbiose, foram obtidos quando as condições ambientais foram favoráveis ao desenvolvimento da cultura, sendo a disponibilidade de carboidratos provenientes da fotossíntese um dos fatores mais limitantes na fixação de azoto (Araújo & Hungria, 1994).

### 1.3.3. Fungos

#### 1.3.3.1. *Pyrenochaeta lycopersici*

*Pyrenochaeta lycopersici* Schneider & Gerlach é um fungo Ascomiceta filamentoso, do género *Pyrenochaeta* e ordem Pleosporales (Clergeot et al., 2012) pertencente ao grupo dos fungos imperfeitos, que produzem apenas esporos assexuados, conídios (Punithalingam and Holliday, 1973). Foi isolado pela primeira vez, em 1929, a partir de plantas de tomate na Inglaterra, e era conhecido como o fungo cinza estéril. Mais tarde, em 1966, com base nas características morfológicas, foi identificado como *Pyrenochaeta lycopersici* (Golzar, 2009; Masheva et al. 2014). Em Portugal, a doença foi detetada pela primeira vez em 1984, em cultivares de tomate Carmelo produzido em estufa (Santa-Marta, 1986).

*P. lycopersici* está descrito em muitos países produtores de tomate a nível mundial, incluindo Portugal e associado a graves prejuízos (Moura & Palminha, 1994; Milc et al., 2012; Santa-Marta, 1986). É um parasita obrigatório com fraca capacidade competitiva, crescimento lento, (Hasna, 2007) é o causador de uma grave doença do tomateiro designada suberose radicular ou “Corky root” (Clergeot et al., 2012; Moura & Palminha, 1994; Santa-Marta, 1986). O fungo infeta as raízes causando lesões no tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) produzido em estufa e ao ar livre (Moura & Palminha, 1994; Fiume & Fiume, 2003;), e muitas outras espécies, algumas de elevado valor comercial, como o pimento (*Capsicum annum* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), beringela (*Solanum melongena* L.), melão (*Cucumis melo* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), espinafre (*Spinacea oleracea* L.), abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), figueira-do-inferno (*Datura stramonium* L.) açafraão (*Carthamus tinctorius* L.) (Shishkoff &

Campbell, 1990; Hasna,2007), e alface (*Lactuca sativa*) (Lemaire et al., 1992; Moura, 1993). Mais recentemente, trabalhos de investigação realizados por Mourão e colaboradores (dados não publicados) evidenciam que a doença está também presente em feijão-verde.

No solo, o fungo multiplica-se por microesclerotos , formados na superfície de raízes ou como micélio nos resíduos de raízes infetadas (Golzar, 2009). Estas estruturas, resistentes à seca e ao calor (Hasna, 2007) são estruturas de hibernação e propágulos primárias no solo, permanecendo dormentes, mas viáveis pelo menos 15 anos. Em condições favoráveis, as hifas germinam a partir do microesclerotos (Aragona et al., 2014), estimulada por exsudatos da raiz da planta hospedeira, como acontece com outros fungos do solo. As hifas infetam as células epidérmicas das raízes infetadas e aproximadamente 48h após a penetração inicial, as células hospedeiras morrem e as hifas secundárias desenvolvem-se dentro delas. Esta fase está associada ao aparecimento de sintomas da doença, como o escurecimento do tecido e necrose das raízes (Figura 1.3.3.1.). As lesões necróticas expandem-se e as paredes celulares são degradadas por enzimas líticas (Aragona et al., 2014).

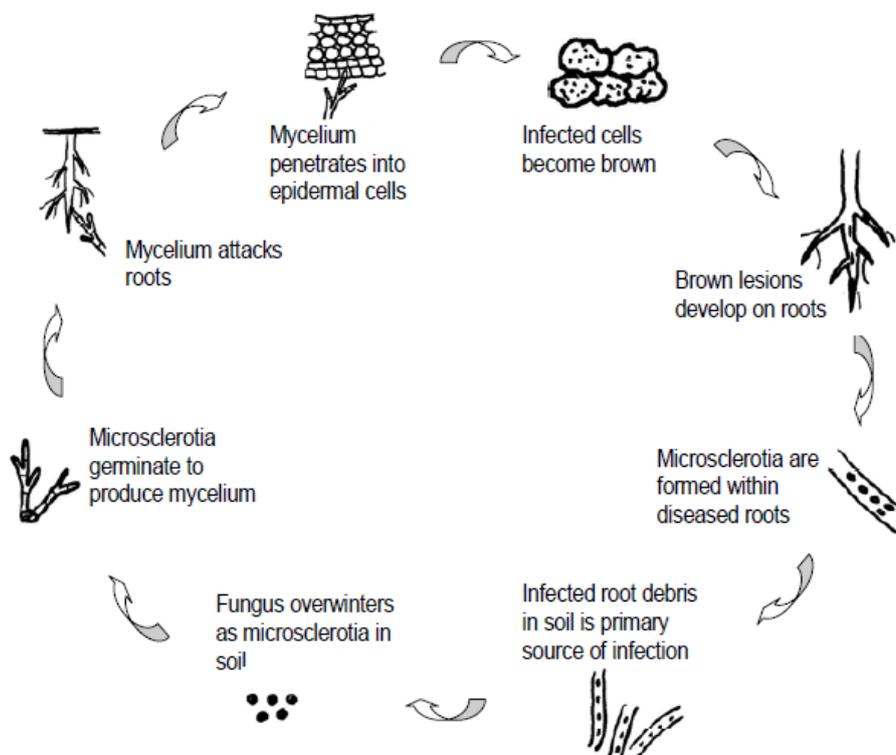
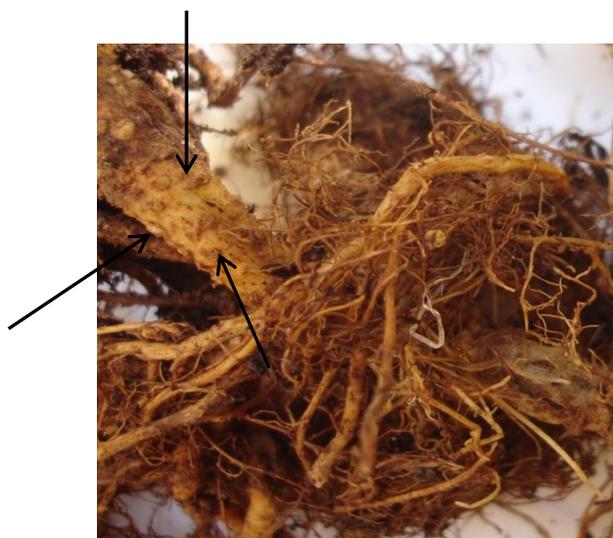


Figura 1.3.3.1. Ciclo de vida do fungo *Pyrenochaeta lycopersici* (Hasna, 2007).

### 1.3.3.2. A doença da suberose radicular e meios de luta

Esta doença foi quase esquecida nos anos 60, uma vez que na altura as culturas eram produzidas em substratos inorgânicos. Os problemas da podridão radicular (sin. suberose radicular) ou “corky root” reapareceram com a produção de culturas em substratos orgânicos ou no solo, entre 1980 e 1990 (Hasna, 2007). O seu principal meio de dispersão é através do movimento do solo contaminado e resíduos vegetais contendo microesclerotos (LeBoeuf et al, 2010). *P. lycopersici* segrega um indutor proteico que provoca a morte celular das plantas hospedeiras, durante a penetração do fungo (Clergeot et al., 2012). O fungo invade o sistema radicular de plantas infetadas, provocando lesões castanhas nas raízes de tamanho médio (Golzar, 2009), causando o apodrecimento das raízes menores, e levando as raízes maduras a desenvolver fissuras e apodrecer (Fiume & Fiume, 2003). Um ataque severo de *P. lycopersici* pode levar à eliminação de raízes, o que significa a perda da seção distal da raiz, deixando apenas as extremidades, castanhas e atarracadas. A principal consequência é um sistema radicular reduzido, e se se formarem novas e pequenas raízes em torno da raiz principal, o sistema radicular torna-se "espesso" (Forsberg et al., 1999). O sintoma típico da doença associado ao aspeto encortiçado das raízes infetadas (Fig. 1.3.3.2.) deu o nome à doença em Portugal de “suberose radicular” (Moura, 1993). Na parte aérea, a primeira indicação da suberose radicular é o aparecimento de plantas debilitada que podem, eventualmente murchar. A produção de frutos é perturbada, resultando em menos e menores frutos. Como resultado desta infeção, a circulação de água e de nutrientes é perturbada, causando uma redução no tamanho do fruto (Moura & Palminha, 1994; Fiume & Fiume, 2003) e no rendimento que podem variar entre 40 a 75% (Golzar, 2009; Moura & Palminha, 1994; Clergeot et al., 2012;). Uma característica importante da doença é que os sintomas são quase imperceptíveis até que a raiz é exposta (Hasna, 2007). As plantas crescem lentamente, podem parecer mais velhas, e apresentam sintomas como os de falta de água (Fiume & Fiume, 2003).



**Figura 1.3.3.2. Sintomas de suberose radicular em raízes de feijão-verde (*Phaseolus vulgaris*).**

O controle do patógeno é muito difícil porque é muito persistente no solo. A aplicação de desinfetantes químicos não sendo muito eficaz, não é permitido em agricultura biológica. Por outro lado, a rotação de culturas em estufa isoladamente também não controla o patógeno (Masheva et al. 2014). Há toda uma série de medidas técnicas que podem ser tomadas a fim de limitar o desenvolvimento da doença, como a incorporação de matéria orgânica. Outros métodos como a solarização e biofumigação do solo (Moura & Palminha; Mihira et al., 1999; Moura et al, 2012), reduzem o nível de inóculo no solo e consequentemente a incidência da doença.

Resultados promissores foram obtidos contra *P. lycopersici* utilizando agentes de controlo biológico, como fungos antagonistas e micoparasitas como *Trichoderma* spp. (Whipps, 1987), bactérias antagonistas, como *Bacillus subtilis* T 99 e *Streptomyces graminofaciens* e nematódes fungívoros.

A estratégia de controle mais eficaz e duradoura contra *P. lycopersici* será a utilização de plantas resistentes. Embora a maioria das variedades de tomateiro cultivadas serem susceptíveis ao fungo, a resistência ocorre em vários parentes silvestres. No entanto, o gene *pyl*, de resistência a *P. lycopersisi*, apresenta expressividade incompleta e, por conseguinte, novas fontes genéticas de resistência são necessárias (Milc et al., 2012).

Porta-enxertos tolerantes a *P. lycopersici* estão disponíveis e quando enxertados numa cultivar comercial de tomateiro permitem uma boa colheita de tomate em solos altamente infestados (Ebben, 1974). O maior rendimento, a partir de plantas enxertadas,

compensa o aumento dos custos, devido ao maior período de crescimento antes da transplantação (Forsberg et al., 1999).

#### **1.4. Objetivos do trabalho**

O feijoeiro, tal como outras leguminosas, apresenta a capacidade de fixar o azoto da atmosfera quando em simbiose com bactérias do género *Rhizobium*, o que pode contribuir para a redução do uso de fertilizantes azotados. Estudos visando o aumento da produtividade do feijoeiro, através da fixação simbiótica do azoto atmosférico, têm mostrado a possibilidade de se obter rendimento de até 1600kg ha<sup>-1</sup>, na ausência de adubação azotada (Ferreira et al, 2002).

Um dos fatores mais limitantes da produtividade do feijoeiro é a baixa disponibilidade de nutrientes, sobretudo P e N, nos solos agrícolas. A adição de N na forma de fertilizante é cara e, em muitos casos, pouco eficiente, sobretudo em decorrência de perdas de elementos causadas por práticas culturais inadequadas. Resultados bibliográficos apontam que é possível a cultura do feijoeiro beneficiar no campo da fixação biológica de N<sub>2</sub>, e o grande desafio que se apresenta é conseguir uma gestão adequada dessa simbiose (Soares et al., 2006).

Os patógenos do solo, herbívoros e mutualistas, que parasitam plantas, influenciam a performance e a habilidade competitiva das espécies de plantas e da sua descendência. Por sua vez, as plantas também afetam seletivamente o biota do solo associados à sua rizosfera e, como consequência, interações de feedback são estabelecidas entre as plantas e os microrganismos do solo. Estas interações são cruciais no tempo e no espaço para a composição natural da comunidade de plantas. Os feedbacks podem alterar a dependência das interações multitróficas entre organismos da rizosfera. Contudo as interações entre mais do que um grupo de organismos do solo tem sido ignorados nos estudos da ecologia (Penã, et al., 2005).

Apesar de serem funcionalmente distintos, os nódulos de rizóbio, as galhas de nemátodes e os sítios de alimentação, compartilham várias características anatômicas e morfológicas. Considerando simultaneamente as evidências fisiológicas, celulares e moleculares, há indicações que essas interações parasitárias e simbióticas são muito parecidas e, às vezes, o seu limite muito ténue, justamente porque são orquestradas por genes quase idênticos, que provavelmente compartilham a mesma origem evolutiva (Junior & Fragoso, 2008)

A enxertia de feijão-verde é uma técnica recente e pioneira em Portugal. Estudos de avaliação dos efeitos da enxertia na produtividade e qualidade de cultivares de feijão-verde têm sido realizados recentemente pela equipa da Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, no âmbito do Projeto Europeu COST FA 1204 - *Vegetable grafting to improve yield and fruit quality under biotic and abiotic stress conditions*. Do mesmo modo, têm sido realizados estudos sobre a avaliação da resistência/tolerância de porta enxertos de feijão-verde a nemátodes *Meloidogyne* spp. e doenças como *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. Estes estudos são essenciais para o desenvolvimento e aperfeiçoamento desta técnica, utilizada na cultura do feijão-verde.

Neste trabalho pretendemos avaliar os efeitos da enxertia de duas cultivares de feijão-verde nas populações de nemátodes fitoparasitas, de bactérias fixadoras de azoto e da incidência da doença da suberose radicular causada pelo fungo *Pyrenochaeta lycopersici*. Pretende-se ainda avaliar o efeito da enxertia na produção de biomassa de raízes de feijão-verde produzido em estufa.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Delineamento experimental do ensaio em estufa

O ensaio foi instalado numa área de cerca de 250m<sup>2</sup> na estufa da Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, com localização geográfica WGS84 x -8° 54' 04" y 41° 79' 09", apresentada na Fig.2.1. O ensaio decorreu nos meses de Abril a Agosto de 2014. Foram utilizadas duas cultivares comerciais de feijão-verde, Fasili e Oriente, sendo testados dois porta-enxertos (P1 e P2), em melhoramento pela empresa Aromas e Flores- Horticultura Lda, Torres Vedras. De cada uma das cultivares comerciais, foram incluídos tratamentos com plantas não-enxertadas (normal), enxertadas em si próprias, enxertadas no porta-enxerto P1 ou enxertadas no porta-enxerto P2, de acordo com o quadro 2.1.



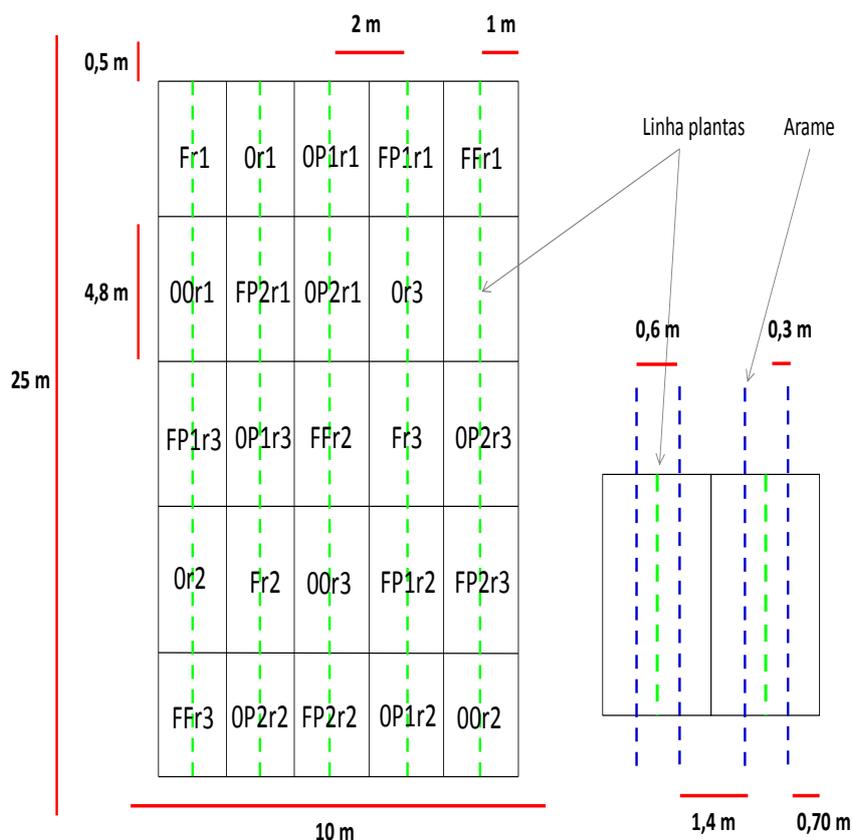
Figura 2.1. Localização da área da estufa onde decorreu o ensaio de feijão – verde enxertado.

No conjunto, foram aplicados oito tratamentos, quatro por cada cultivar enxertada, sendo cada tratamento repetido três vezes em talhões distribuídos aleatoriamente, o que fez vinte e quatro talhões com um delineamento experimental totalmente casualizado.

**Quadro 2.1. Cultivares de feijoeiro utilizadas em cada um dos tratamentos e respectivas abreviaturas.**

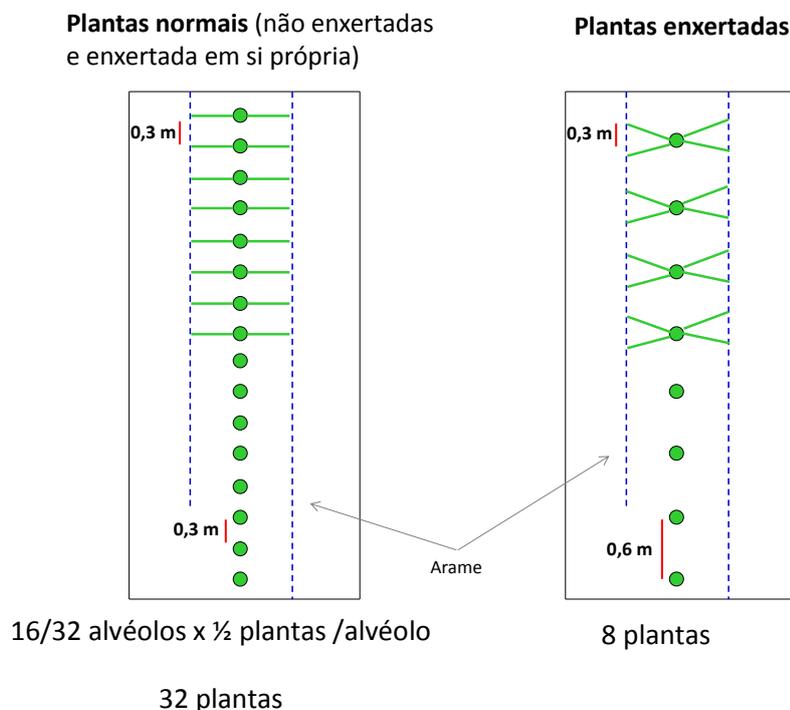
<b>Tratamento</b>	<b>Abreviatura</b>
Fasili - normal	F
Fasili - enxertada em Fasili	FF
Fasili - enxertada em P1	FP1
Fasili – enxertada em P2	FP2
Oriente - normal	O
Oriente - enxertada em Oriente	OO
Oriente – enxertada em P1	OP1
Oriente – enxertada em P2	OP2

Em cada talhão de 9,6 m<sup>2</sup> foram colocadas as plantas correspondentes a cada tratamento, de acordo com o esquema constante na Fig. 2.1.1. Nos tratamentos F, FF, O e OO, foram colocadas duas plantas por alvéolo, com um compasso de 0,3m entre alvéolos, a conduzir a uma haste por planta. Nos tratamentos FP1, FP2, OP1 e OP2, foram colocadas duas plantas por alvéolo, a conduzir a duas hastes por planta. A distância entre linhas foi de 2 metros.



**Figura 2.1.1. Distribuição dos tratamentos nos talhões experimentais e esquema de plantação do ensaio.**

Dividindo a área de cada talhão (9,6 m<sup>2</sup>) pelo número de hastes das plantas normais e das plantas enxertadas em si próprias obtemos 3,3 plantas por metro quadrado. Para as plantas enxertadas em P1 e P2 obtemos 0,83 plantas por metro quadrado. Para todos os tratamentos, o número de hastes total foi de 32 (Fig. 2.1.2).



**Figura 2.1.2.** Esquema de plantação de cada talhão, considerando tratamentos com plantas normais ou enxertadas.

O sistema de rega utilizado foi o sistema de gotejador localizado de 30 em 30 cm, para os tratamentos F, FF, O e OO e de 60 em 60 cm nos tratamentos FP1, FP2, OP1 e OP2, com plantas enxertadas em P1 e P2.

Foram aplicados, na área total do ensaio, 500kg de composto proveniente de uma pilha estática de compostagem de estrume de ovelha com palha de milho, 100kg de calcário e 5kg de fosfato Gafsa (26,5 %). Foi inicialmente aplicada metade do calcário e do composto, lavrando-se depois o solo, seguidamente foi aplicado a outra metade do calcário e o fosfato, sendo então o solo escarificado ou gradado.

## **2.2 Extração, identificação e quantificação de nemátodes fitoparasitas**

### **2.2.1. Nemátodes fitoparasitas no solo**

Foram realizadas amostragens de solo para análise nematológica à data da plantação do ensaio (23 e 24 de Abril de 2013), a meio da cultura (30 de Maio e de Junho) e no final da cultura (4 e 5 de Agosto de 2013). De cada talhão, foram recolhidas amostras compostas de três sub-amostras de solo até 20 cm de profundidade. De cada amostra assim obtida, foram separados 100 cc que foram processados pelo Método do Tabuleiro, durante 48h para a extração de nemátodes ativos (Whitehead & Hemming, 1965; adaptado por Abrantes et al., 1976). Resumidamente, 100 cc de solo, livre de pedras ou pedaços de raiz, foi espalhado uniformemente em papel *kleenex* em cima de uma grelha de plástico dentro de um tabuleiro. Foi depois enchido o tabuleiro com água da torneira até inundar o solo, permitindo a migração dos nemátodes para a água. Após 48 horas, a suspensão de nemátodes foi crivada através de um crivo metálico de 20 µm de poro para reduzir o volume para cerca de 10-20 ml. Os nemátodes assim recolhidos foram posteriormente observados ao microscópio invertido. Os nemátodes fitoparasitas foram classificados até ao género, com base na sua morfologia, seguindo chaves dicotómicas (Mai and Mullin 1996; Tarjan et al. 1977).

### **2.2.2. Nemátodes fitoparasitas nas raízes de feijoeiro**

#### ***Meloidogyne* spp.**

Foram feitas duas recolhas de raízes para observação de danos potencialmente causados por nemátodes fitoparasitas: a primeira a meio do ciclo cultural (30 de junho e 1 de julho) e a outra no final da cultura (4 e 5 de agosto). As raízes foram retiradas da terra e colocadas num saco individual de plástico devidamente identificado. No mesmo dia, foram transportadas da estufa para o laboratório, onde foram observadas. Primeiramente foi feita a separação das raízes da terra e turfa envolvente; depois as raízes foram colocadas em tabuleiros e lavadas com água da torneira, de modo a retirar todas as partículas de solo aderentes. Foram então contabilizadas as galhas induzidas por NGR, do género *Meloidogyne*, sendo a infeção do sistema radicular estimada pela classificação de (Bridge & Page, 1980) (Anexo 2).

Seguidamente procedeu-se à determinação do número de massas de ovos de NGR. Para tal, as raízes foram mergulhadas durante 15 minutos numa solução de Floxina B 0,0015% em água (Hartman, K. 1983). Após a coloração, as raízes foram passadas por água, de modo a retirar o excesso de corante, antes de serem contadas as massas de ovos coradas de vermelho.

Para determinação do número médio de ovos produzido por massa de ovos, foram separadas 10 galhas simples com massas de ovos aderidas para um microtubo, ao qual se adicionou 200 µl de hipoclorito de sódio 1 a 2% (lixívia diluída); agitou-se no vórtex 30 segundos para dissolver a matriz gelatinosa que agrega os ovos e diluiu-se a suspensão resultante em 20 ml de água (adaptação de Hussey and Barker, 1973). Foram feitas 3 contagens de ovos e j2 em 1 ml para produzir uma estimativa do número total na suspensão.

### ***Pratylenchus* spp.**

Aquando da amostragem de raízes a meio e no final da cultura, foram separadas raízes finas (1g) de cada amostra, que se conservaram mergulhadas em água em frascos à temperatura ambiente durante 10 dias e depois no frigorífico até à observação. Agitou-se bem cada um dos frascos e coou-se um pouco de água, sem raízes, para um copo de vidro (a suspensão foi observada na totalidade). Verteu-se um pouco dessa água para a placa de contagem e colocou-se a mesma na mesa do microscópio invertido. Percorreu-se a placa de cima para baixo em movimento serpenteantes, de modo a encontrar e identificar os nemátodes fitoparasitas que, embora se encontrassem dentro da raiz, mantivessem mobilidade. Registou-se o número dos nemátodes endoparasitas migratórios *Pratylenchus*, identificados através da estrutura da cabeça, estilete, e aparelho digestivo e reprodutor, para cada tratamento. Esta parte do trabalho foi realizada com o apoio da Prof. Doutora Teresa Almeida, do Departamento de Biologia da Universidade do Minho.

## **2.3. Avaliação da nodulação e das comunidades de rizóbios nas raízes de feijoeiro**

### **2.3.1. Quantificação da nodulação das raízes de feijoeiro por rizóbios**

A contagem dos nódulos de rizóbio nas raízes foi realizada em simultâneo com a contagem do número de galhas NGR, a meio e no final da cultura, após a lavagem das raízes. O número de nódulos por sistema radicular foi registado numa tabela de acordo com o tratamento. No final da cultura, foi feita uma recolha de nódulos de fragmentos de raiz recolhidos dos vários talhões.

### **2.3.2. Isolamento e caracterização cultural e morfológica de rizóbios**

De cada talhão, separaram-se 10 nódulos das raízes de feijoeiro de forma mais ou menos circular e com cor clara. Os nódulos foram desinfetados superficialmente através de imersão em hipoclorito de sódio a 5%, lavando-se seguidamente com água estéril 5 vezes. Cada nódulo foi então esmagado individualmente numa gota de água estéril e a suspensão bacteriana resultante foi riscada numa placa de petri contendo meio YMA (Yeast Manitol Agar ou Agar Manitol levedura, constituído por 15 g de BactoAgar; 10 g de Manitol; 0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 0,1 g de NaCl; 0,5 g de Yeast Extract e 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Juntou-se ao meio o corante vermelho do congo, que não é geralmente absorvido por colónias de rizóbio, permitindo uma mais rápida diferenciação visual destas bactérias, para proceder ao seu isolamento (Vincent, 1970).

Com a ajuda de uma ansa, na câmara de fluxo laminar, isolaram-se as colónias de rizóbio, que surgiam brancas contra o fundo avermelhado do meio, para placas de Petri com YMA com vermelho do congo. Selaram-se as placas com parafilme, e identificaram-se com o tratamento e a data. Colocaram-se as placas na estufa, durante pelo menos dois dias, a 25°C. Observou-se o crescimento das colónias e separaram-se as placas com colónias de rizóbio isoladas.

Efetuuou-se a caracterização morfológica das colónias seguindo Vicent, 1970. Para a caracterização da natureza alcalina ou ácida dos metabolitos dos isolados de rizóbio inocularam-se placas com meio YMA, ao qual se adicionou 5 ml de uma solução stock de Azul de bromotimol.

Colocaram-se as placas na estufa e observou-se a cor do meio de cultura, ao fim de dois dias (rizóbio de crescimento rápido) e ao fim de sete dias (rizóbio de crescimento lento). Após o registo, reservaram-se as placas no frigorífico.

Para a preservação da colecção de rizóbio obtida a partir das raízes de feijão, utilizou-se o KIT Cryoinstat Mixed TA8276, seguindo as recomendações do fabricante. Os tubos com os isolados devidamente identificados foram preservados a – 80°C.

### 2.3.3. Caraterização molecular dos isolados de rizóbios

Da colecção de isolados obtida, seleccionaram-se dois isolados por repetição (talhão) de cada tratamento F, FF, O e OO do ensaio (Quadro 2.1) para caraterização molecular utilizando o primer BOX A1R (Quadro 2.3.3). Foram ainda incluídos rizóbios isolados do feijoeiro *Phaseolus coccineus* cv. Feijão de 7 anos, uma cultivar regional, para fins comparativos.

**Quadro 2.3.3 – Isolados de rizóbio obtidos das raízes de feijoeiro do ensaio em estufa e seleccionados para caraterização molecular.**

Tratamento	Isolados
(Feijão 7 anos)	F7D, F7H
F	Fr1H, Fr1J1, Fr2A, Fr2F, Fr3A, Fr3B
FF	FFr1G, FFr1I, FFr2B, FFr2C, FFr3B, FFr3D
O	Or1F, Or1G2, Or2A2, Or2B2, Or3F2, Or3M2
OO	OOr1C, OOr1H, OOr2G, OOr2I2, OOr3F

A partir de culturas puras com 48 horas de crescimento, com uma ponta de uma micropipeta esterilizada, tocou-se numa colónia isolada de rizóbio e depositou-se num microtubo com 50 µl de água destilada esterilizada, agitando-se seguidamente no vórtex. Para a extração de DNA submetem-se as amostras a um choque térmico de 95°C durante 10 minutos, tendo-se colocado, para esse efeito, os microtubos num termociclador (Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400). Os tubos foram depois colocados em gelo até arrefecerem e foram conservados a 4°C até à amplificação de DNA por PCR (feita de seguida).

Foram preparados microtubos contendo 10 µl da solução ReadyMix RedTaq e 1µl do primer BOX A1R e 9 µl da solução de DNA ‘template’ obtida anteriormente, ou 9 µl de água ultra pura, como testemunha negativa da reacção de PCR. Os microtubos

foram colocados no termociclador, sendo sujeitos ao programa constante do Quadro 2.3.3.1.

**Quadro 2.3.3.1. Programa de PCR para a amplificação de sequências repetidas pelo primer BOX A1R.**

<b>1</b>	95°C	7 minutos	35 ciclos
<b>2</b>	94°C	1 minuto	
<b>3</b>	53°C	1 minuto	
<b>4</b>	72°C	4 minutos	
<b>5</b>	72°C	10 minutos	
<b>6</b>	4°C	+∞	

Os produtos da PCR descrita acima foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% em TBE, a 100V. Tanto o gel de agarose como o tampão da tina (TBE) continham o corante fluorescente GelRed, para coloração e visualização do DNA. Além das amostras, foram aplicados no gel dois marcadores de peso molecular de 1 Kbp para avaliação do peso dos fragmentos de DNA produzidos.

Os fragmentos de DNA foram visualizados sob a forma de bandas nos géis de agarose, iluminados por luz ultravioleta, sendo as imagens dos géis guardadas em suporte digital para posterior análise.

Procedeu-se à interpretação da mobilidade relativa das bandas, utilizando as bandas obtidas da ladder 1 Kbp como referência, sendo para tal utilizado o programa GelAnalyzer. As bandas produzidas nas linhas correspondentes às amostras a analisar foram corrigidas manualmente, sendo calculada o seu peso em pares de bases por extrapolação tendo como referência as bandas dos marcadores. Com estes valores, foi construída uma matriz binária em Excel para Windows para o conjunto das amostras, sendo a presença de bandas com determinado peso molecular (+/- 5 bp) assinalado com '1' e a sua ausência com '0'. A partir desta matriz foi construído um dendrograma com distâncias euclidianas utilizando o programa Past 3.04 (Hammer et al., 2001).

#### **2.4. Avaliação da incidência e severidade de suberose radicular (*Pyrenochaeta lycopersici*)**

A avaliação da incidência de suberose radicular foi feita apenas na amostragem de raízes realizada a 4 e 5 de Agosto. As raízes foram lavadas e observadas para

atribuição do grau de severidade da doença, tendo-se utilizado para tal a escala proposta por Palminha (1988) e Moura (1993) para a cultura do tomateiro, e apresentada no Quadro 2.4.

**Quadro 2.4. Escala de valores utilizada para avaliação de sintomas de suberose radicular (Palminha,1988 e Moura, 1993).**

<b>Índice</b>	<b>Sintomas radiculares</b>
<b>0</b>	raiz sã
<b>1</b>	raiz com necroses castanho claras raras
<b>2</b>	raiz com necroses castanho-claras de frequência média
<b>3</b>	raiz com necroses castanho-claras geral ou pouco escuras
<b>4</b>	raiz com necroses castanho-escuras (50%) e «corky-root» (25%)
<b>5</b>	raiz com necroses castanho-escuras (80%) e 50% de «corky-root»

## **2.5. Determinação de peso seco e peso fresco das raízes de feijoeiro**

Para determinação do peso fresco da raiz, colocou-se um goblé na balança e retirou-se o valor da tara. De seguida, colocou-se a raiz de cada planta a analisar no goblé e registou-se o seu valor.

Colocaram-se depois as raízes num saco de papel identificado com o tratamento e levou-se para a estufa a 50°C durante três dias. Retiraram-se os sacos da estufa, e determinou-se o peso seco de cada raiz.

De cada sistema radicular ainda fresco, foi separado 1 g de raízes finas, que se utilizaram na deteção de nemátodes do género *Pratylenchus* (ver 2.2.2).

## **2.6. Análise estatística dos resultados**

A análise estatística dos resultados foi realizada com o software Statistical Package for Social Sciences – SPSS for Windows. Foi verificada a homogeneidade de variâncias dos conjuntos de dados pelo teste de Levene antes de comparar o efeito dos vários tratamentos ou de diferentes datas de amostragem através de ANOVA. A identificarem-se diferenças significativas, estas foram averiguadas através do teste de LSD a 5%.

### 3.Resultados

#### 3.1. Nemátodes fitoparasitas

##### 3.1.1. Nemátodes fitoparasitas no solo

Na identificação dos géneros de nemátodes presentes nas suspensões do solo, só foram observados os tratamentos F, FF, O e OO, uma vez que por irrigação insuficiente, as plantas dos tratamentos enxertados em P1 e P2 estavam em stress hídrico severo.

Foram identificados um total de sete géneros de nemátodes fitoparasitas nos vários tratamentos e datas de amostragem do ensaio: os ectoparasitas *Helicotylenchus*, *Paratylenchus*, *Rotylenchus*, *Tylenchorhynchus* e *Xiphinema*; os endoparasitas *Meloidogyne* e *Pratylenchus*.

No que diz respeito ao género *Helicotylenchus* verificou-se pela análise dos dados que houve um aumento do número de nemátodes presentes no solo, do início da cultura para o final, existindo uma diferença significativa no tratamento OO.

Não houve diferenças significativas entre os tratamentos F, FF, O ou OO para cada data de amostragem.

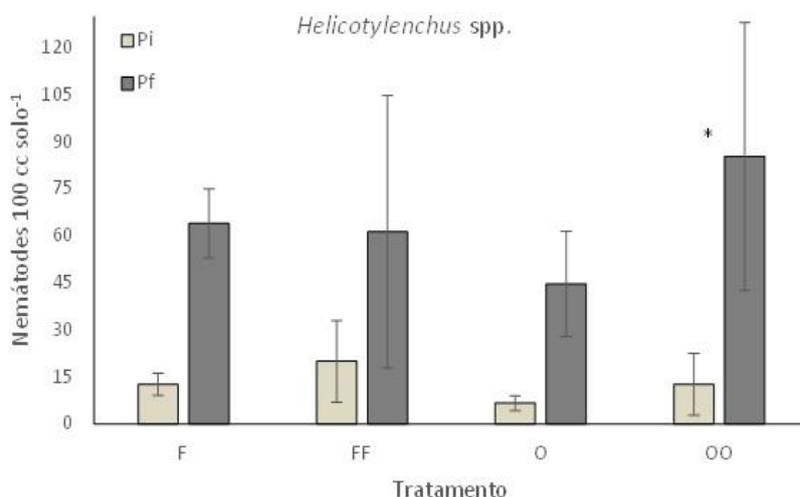
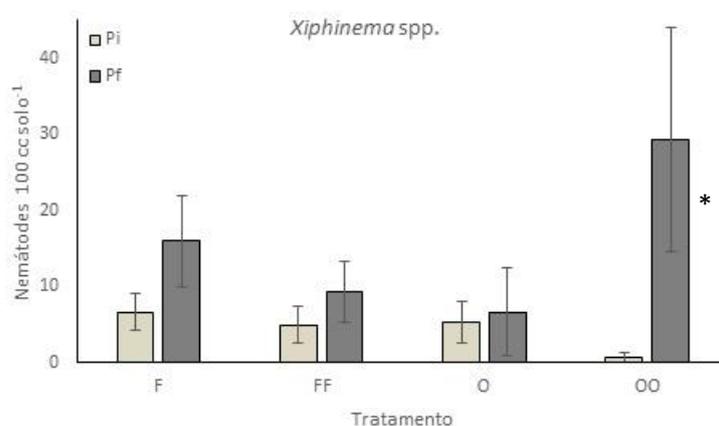


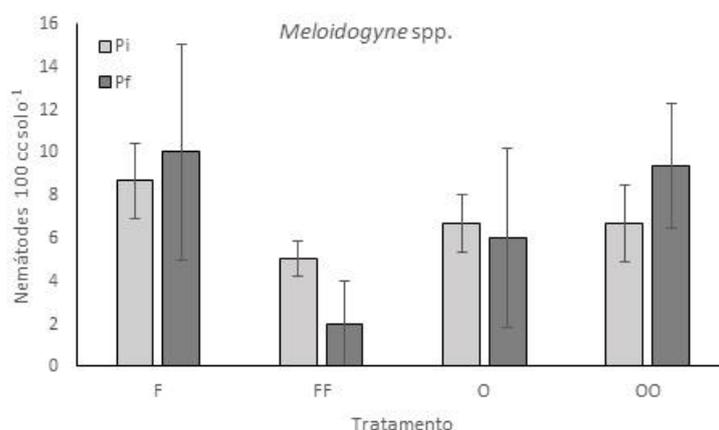
Figura 3.1.1. Número de nemátodes *Helicotylenchus* spp. no solo no início (Pi) e no final da cultura (Pf) do feijoeiro, nos tratamentos F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

Quanto ao género *Xiphinema*, não se verificou uma diferença significativa no que se refere aos tratamentos F, FF, O ou OO. Notou-se em todos os tratamentos um aumento no número de nemátodes do género do início da cultura para o final, sendo que, no tratamento OO, houve uma diferença significativa.



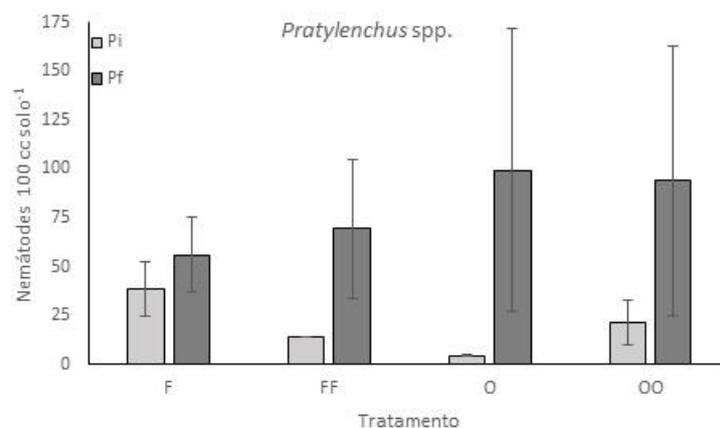
**Figura 3.1.1.1.** Número de nemátodes *Xiphinema* spp. no solo no início (Pi) e no final da cultura (Pf) do feijoeiro nos tratamentos F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

No que concerne ao género *Meloidogyne*, verificou-se também um aumento no número de nemátodes no solo no tratamento F e OO. Nos outros dois tratamentos FF e O, verificou-se uma diminuição do número de nemátodes do género *Meloidogyne* entre as duas datas de amostragem. Estas diferenças não foram, no entanto, estatisticamente significativas.



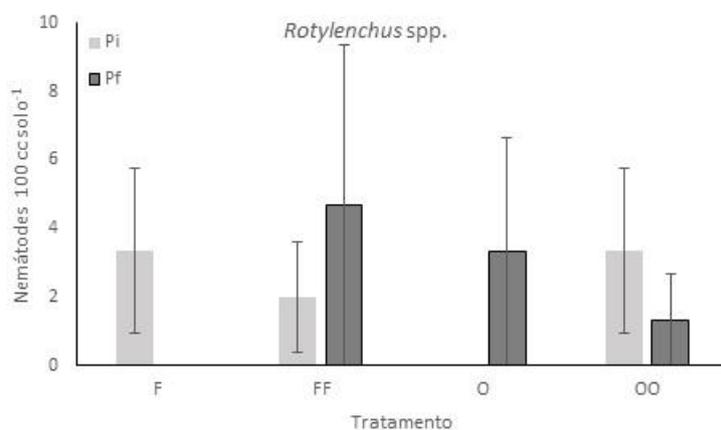
**Figura 3.1.1.2.** Número de nemátodes *Meloidogyne* spp. no solo no início (Pi) e no final da cultura (Pf) do feijoeiro nos tratamentos F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

Quanto ao número de nemátodes do género *Pratylenchus*, foi registado um aumento (não significativo) em todos os tratamentos ao longo da cultura do feijoeiro.



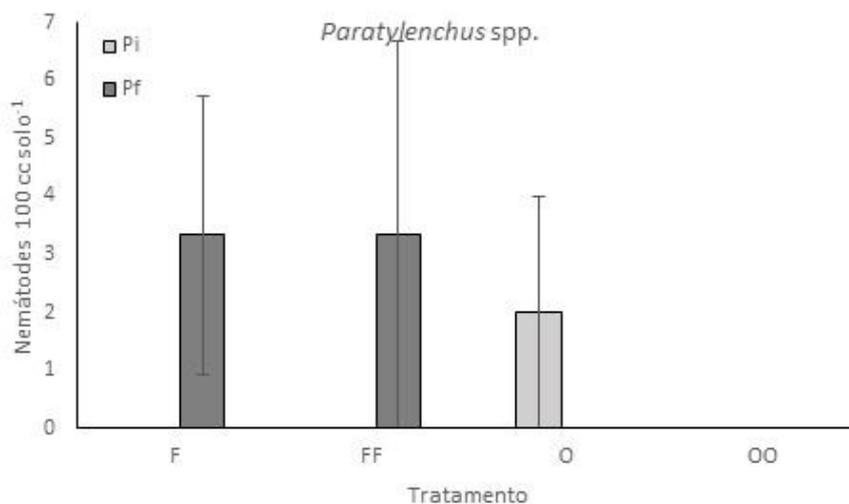
**Figura 3.1.1.3.** Número de nemátodes *Pratylenchus* spp. no solo no início (Pi) e no final da cultura (Pf) do feijoeiro nos tratamentos F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

Quanto ao género *Rotylenchus* notou-se um aumento no número de nemátodes no tratamento FF e no tratamento O. No tratamento F, não foram encontrados nemátodes do género *Rotylenchus* no fim da cultura. Do mesmo modo, verificou-se uma diminuição no número de nemátodes no tratamento OO no final da cultura do feijoeiro.



**Figura 3.1.1.4.** Número de nemátodes *Rotylenchus* spp. no solo no início (Pi) e no final da cultura (Pf) do feijoeiro nos tratamentos F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

No que se refere ao género *Paratylenchus* só foram detetados nemátodes nos tratamentos F, FF e O. No tratamento OO não foram registados estes nemátodes. Nos tratamentos F e FF verificou-se um aumento no número de nemátodes, no final da cultura enquanto que no tratamento O foram registados alguns nemátodes no início da cultura mas no final não foram encontrados nemátodes deste género. As diferenças observadas não foram estatisticamente significativas.



**Figura 3.1.1.5.** Número de *Paratylenchus* spp. no solo no início (Pi) e no final da cultura (Pf) do feijoeiro nos tratamentos F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

No género *Tylenchorhynchus* verificou-se um aumento do número de nemátodes nos quatro tratamentos avaliados, registando-se uma diferença significativa no tratamento FF entre a população final e a população inicial. Houve também diferenças significativas entre a população inicial nos vários tratamentos.

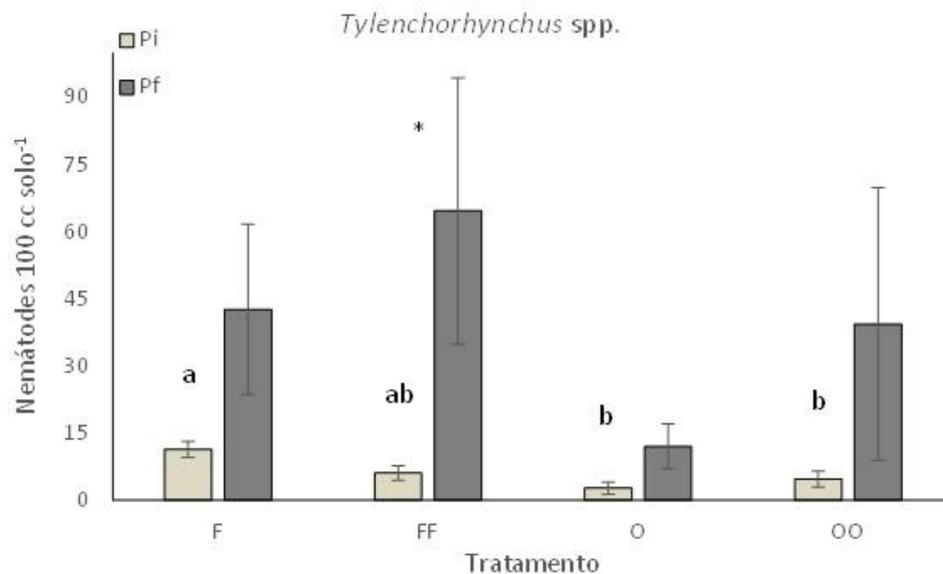


Figura 3.1.1.6. Número de nemátodes *Tylenchorhynchus* spp. no solo no início (Pi) e no final da cultura (Pf) do feijoeiro nos tratamentos F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

Analisando o quadro 3.1.1. pode-se afirmar que os talhões que apresentaram maior número de nematodes fitoparasitas, no solo, no início da cultura foram os pertencentes ao tratamento F (203). No final da cultura, o maior número de nemátodes fitoparasitas foi observado no tratamento OO.

Quadro 3.1.1. Diferença entre a Média do número de nemátodes fitoparasitas no solo, no final da cultura e a média do número de nemátodes fitoparasitas no solo, no início da cultura.

Tratamento	MF	MI	Diferença
<b>F</b>	291	203	88
<b>FF</b>	361	92	269
<b>O</b>	251	97	154
<b>OO</b>	438	98	340

No que se refere ao tratamento que apresentou uma maior diferença entre a população de nemátodes no início da cultura e no final da cultura, este foi OO.

**Quadro 3.1.1.1. Média do número de géneros de nemátodes presentes no solo antes e após da cultura do feijoeiro.**

Tratamento	Número de Géneros	
	Antes da cultura	Após a cultura
F	6,6	6,6
FF	4,3	6
O	6	5,6
OO	5,6	6

No que diz respeito ao número de géneros por cultivar, verificou-se que no início da cultura, os tratamentos F, FF, O e OO apresentavam todos os géneros de nemátodes identificados com exceção de *Paratylenchus* spp.

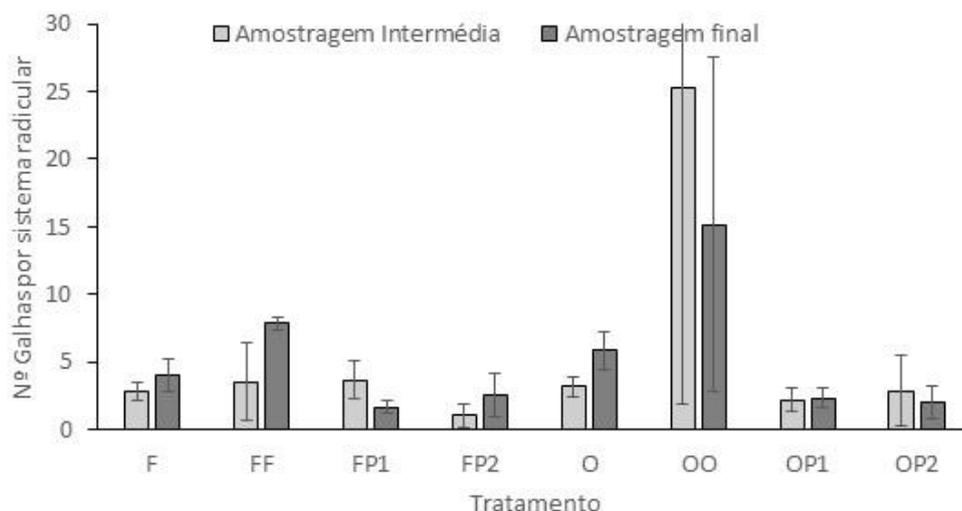
No que refere ao final da cultura, verificou-se que os tratamentos O e OO tinham associados todos os géneros observados de nemátodes com exceção de *Paratylenchus*. No tratamento F não foram detetados nemátodes do género *Rotylenchus*, enquanto que em FF foram encontrados todos os géneros de fitoparasitas observados.

Quanto aos géneros de endoparasitas *Pratylenchus* e *Meloidogyne*, verificou-se que eles aparecem no solo da estufa, tanto no início da cultura como no final, em todos os tratamentos (F, FF, O e OO). No início da cultura, o género *Pratylenchus*, apareceu em grande quantidade associado ao tratamento F e em menor quantidade no tratamento O. Quanto ao género *Meloidogyne* foi encontrado em maior quantidade associado às plantas do tratamento F e em menor quantidade no tratamento FF.

No que se refere ao final da cultura, nemátodes do género *Pratylenchus* foram encontrados em maior quantidade no tratamento O e em menor quantidade no tratamento F. Para o género *Meloidogyne* verificou-se uma maior quantidade nos tratamentos F e OO e menor quantidade no tratamento FF.

### **3.1.2. Nemátodes fitoparasitas nas raízes de feijoeiro**

No que se refere ao género *Meloidogyne* verificou-se que da amostragem intermédia para a final houve um aumento no número de nematodes nos tratamentos F, FF, FP2 e O. No tratamento OP1 o número manteve-se aproximadamente constante e notou-se uma diminuição nos tratamentos FP1, OO e OP2, sendo que a maior diferença foi sentida no tratamento OO. Estas diferenças não foram estatisticamente significativas.



**Figura 3.1.2.** Número de galhas detectadas por sistema radicular de feijoeiro nas amostragens intermédia e final dos tratamentos do ensaio F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; FP1- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P1; FP2- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P2; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria; OP1- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P1; OP2- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P2. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

Quanto ao número de massas de ovos e de ovos de *Meloidogyne* spp. na amostragem intermédia só foram detetadas duas massas de ovos no tratamento OO, onde não foram encontrados ovos. Na amostragem final foram encontradas massas de ovos e ovos nos quatro tratamentos (F, FF, O e OO), sendo que o maior número de ovos foi detetado nas raízes do feijoeiro cvs. Fasili e Oriente não enxertadas.

**Quadro 3.1.2.** Número de massas de ovos e ovos de *Meloidogyne* spp. presentes nas raízes das plantas dos tratamentos F, FF, O e OO, na amostragem intermédia e final.

Tratamento	Amostragem Intermédia		Amostragem Final	
	Massas de ovos	Ovos	Massas de ovos	Ovos
F	0	0	9	1232
FF	0	0	3	577
O	0	0	5	1327
OO	2	0	51	960

No que concerne ao género *Pratylenchus*, não foram detetados nemátodes nas raízes das plantas de feijoeiro da amostragem intermédia. O mesmo não se verificou na amostragem final, onde foram encontrados nemátodes deste género nos tratamentos F, O e OO. No tratamento FF, não foram detetados nemátodes deste género em nenhuma das amostragens.

Quadro 3.1.2.1. Número de nemátodes *Pratylenchus* spp. presentes nas raízes das plantas dos tratamentos F, FF, O e OO, nas amostragens intermédia e final.

Tratamento	Amostragem Intermédia	Amostragem final
F	0	1
FF	0	0
O	0	8
OO	0	2

### 3.2. Comunidades de rizóbios nas raízes de feijoeiro

#### 3.2.1. Nodulação das raízes

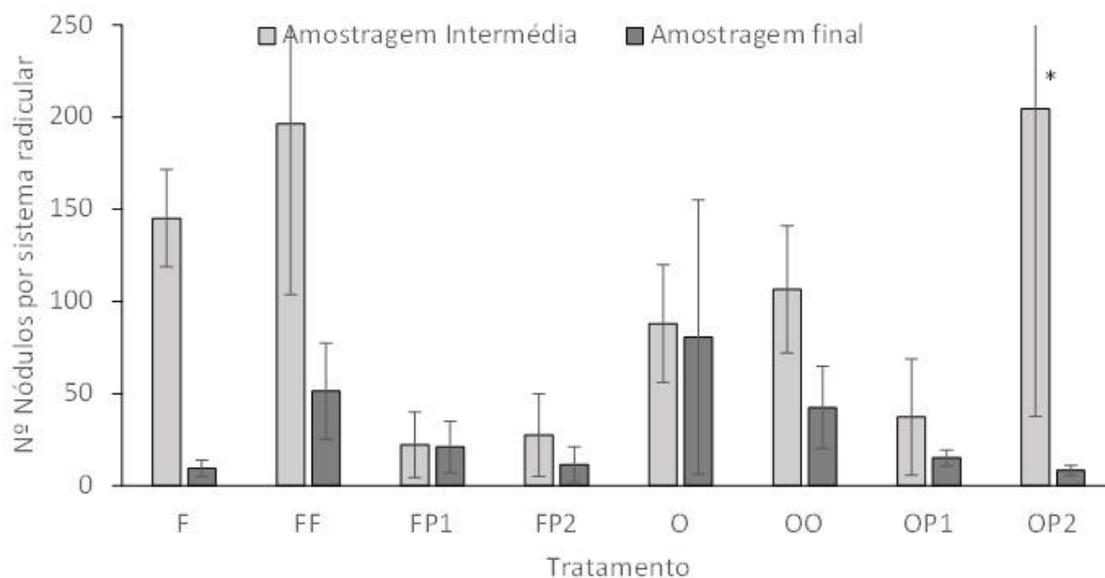


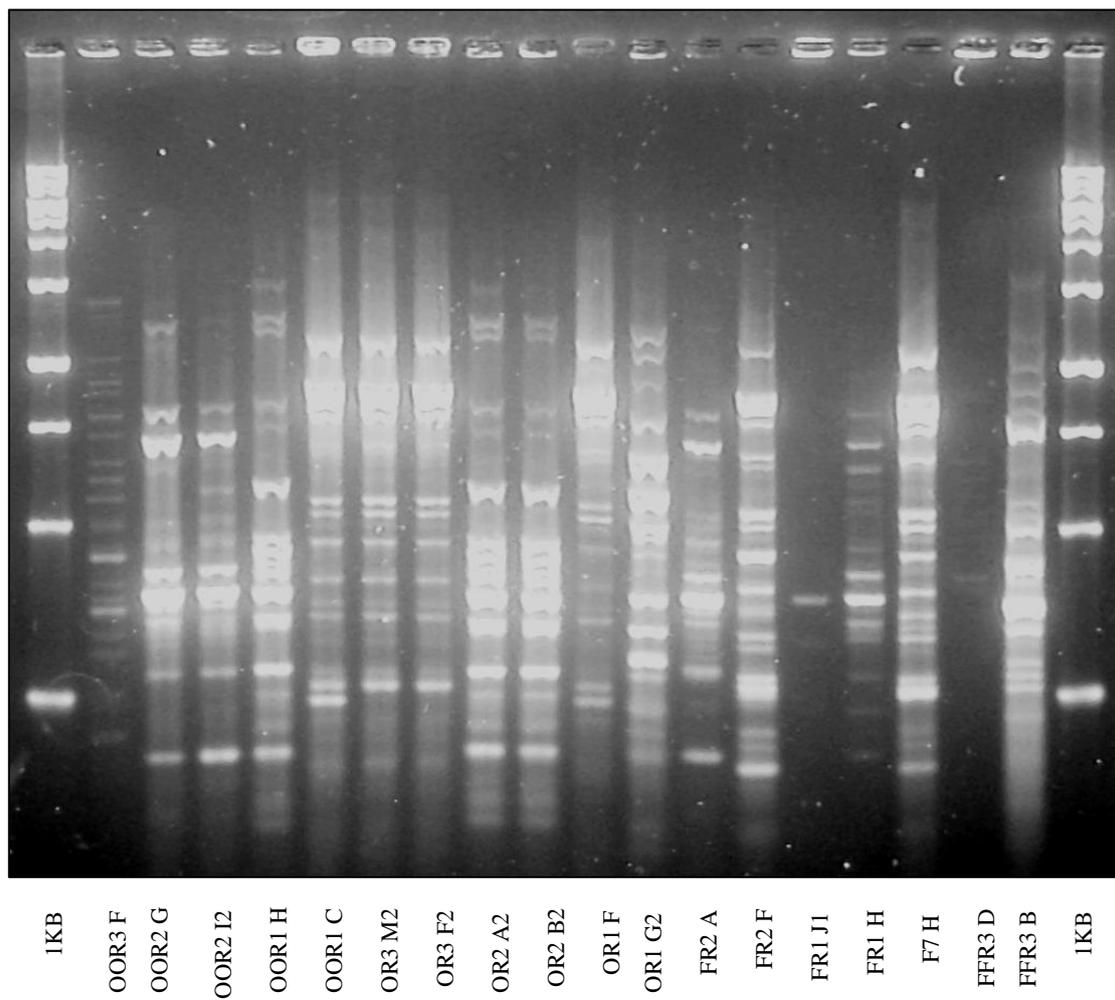
Figura 3.2.1. Número de nódulos de rizóbio detectadas por sistema radicular de feijoeiro nas amostragens intermédia e final dos tratamentos do ensaio F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; FP1- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P1; FP2- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P2; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria; OP1- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P1; OP2- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P2. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

### 3.2.2. Caracterização morfológica e cultural dos isolados de rizóbio

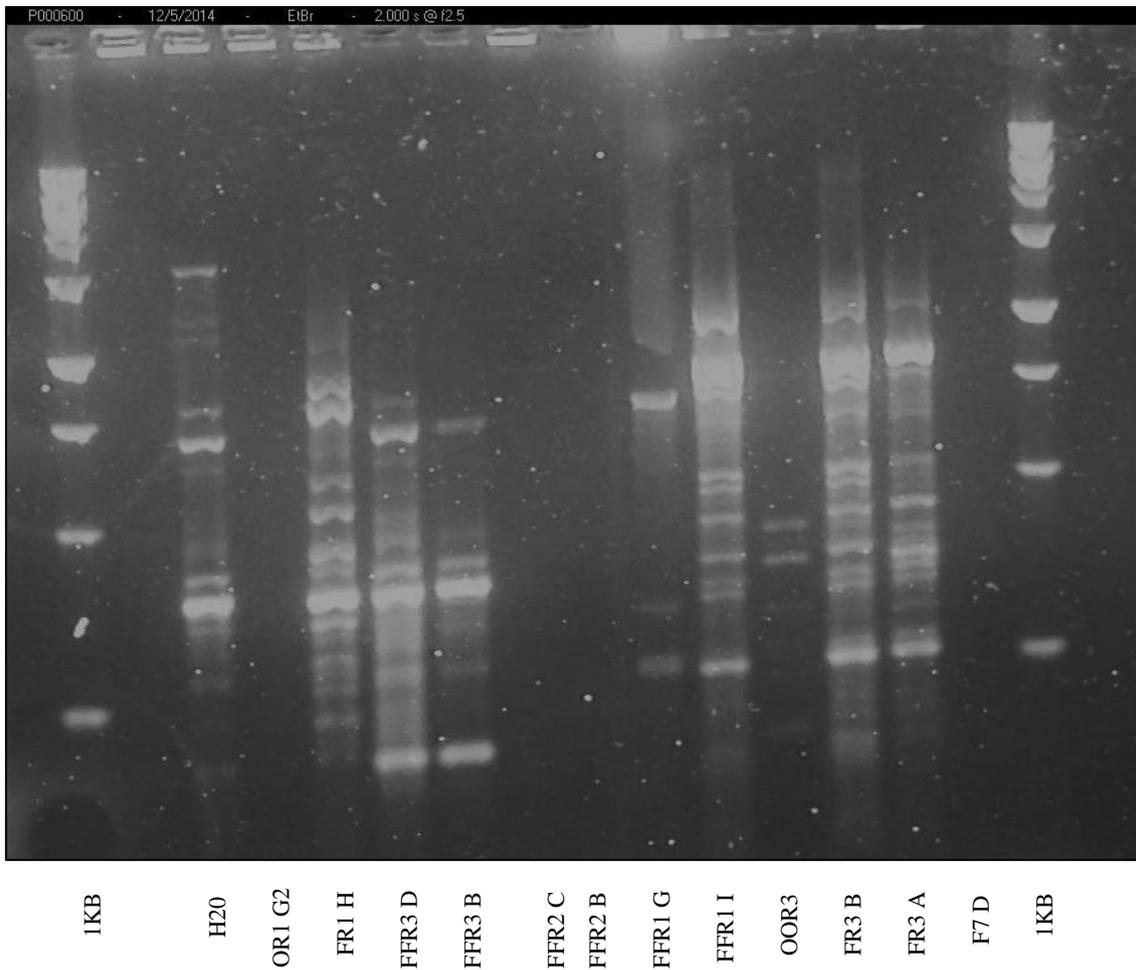
Isolados	Cor	Avaliação	Crescimento	Colónia
FR1 H	amarelo	acidificou	rápido	colónia branca, mucóide, pequena
FR1 J1	amarelo	acidificou	rápido	colónia branca, mucóide, pequena
FR2 A	amarelo	acidificou	rápido	colónia branca, mucóide, pequena
FR2 F	amarelo	acidificou	rápido	colónia branca, mucóide, pequena
FR3 A	amarelo	acidificou	rápido	colónia branca, mucóide, pequena
FR3 B	amarelo	acidificou	rápido	colónia branca, mucóide, pequena
FFR1 G	amarelo	acidificou	rápido	colónia mucóide branca, pequena (parte central rosa pálido)
FFR1 I	azul	alcalinizou	lento	colónia branca, com pouco muco
FFR2 B	amarelo	acidificou	rápido	colónia branca, mucóide, pequena
FFR2 C	amarelo	acidificou	rápido	colónia branca, mucóide, pequena
FFR3 B	amarelo	acidificou	rápido	colónia mucóide branca, pequena
FFR3 D	amarelo	acidificou	rápido	colónia branca, mucóide
OR1 F	amarelo	acidificou	rápido	colónia branca, mucóide, pequena
OR1 G2	azul	alcalinizou	lento	colónia branca mucóide com ponto rosa no centro
OR2 A2	amarelo	acidificou	rápido	colónia branca, mucóide, pequena
OR2 B2	amarelo	acidificou	rápido	colónia branca, mucóide, pequena
OR3 F2	amarelo	acidificou	rápido	colónia mucóide branca, pequena
OR3 M2	amarelo	acidificou	rápido	colónia mucóide branca, pequena
OOR1 C	amarelo	acidificou	rápido	colónia branca, pouco mucosa, pequena
OOR1 H	amarelo	acidificou	rápido	colónia mucóide branca, pequena
OOR2 G	amarelo	acidificou	rápido	colónia mucóide branca, pequena
OOR2 I2	amarelo	acidificou	rápido	colónia mucóide branca, pequena
OOR3	azul	alcalinizou	lento	colónia mucóide branca, pequena
OOR3 F	amarelo	acidificou	rápido	colónia branca, mucóide, com ponto rosa no centro
F7 D	amarelo	acidificou	rápido	colónia branca, mucóide, pequena
F7 H	amarelo	acidificou	rápido	colónia branca, mucóide

### 3.2.3. Caracterização molecular dos isolados de rizóbios

Após amplificação utilizando o primer BOX A1R do DNA dos isolados de rizóbios obtidos a partir das raízes de feijoeiros do ensaio, obtiveram-se os perfis genéticos apresentados nas figuras 3.4.1. e 3.4.1.1.

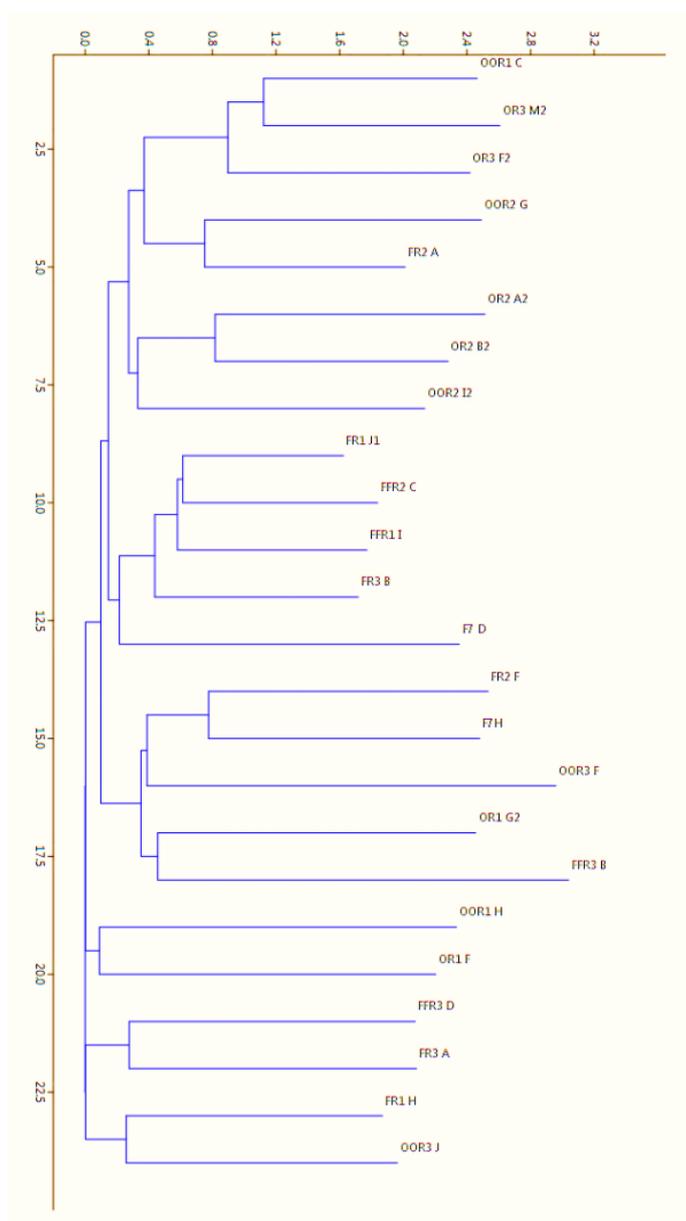


**Figura 3.2.3. Perfis de DNA dos isolados de rizóbios obtidos das raízes de feijoeiro dos vários tratamentos do ensaio. Marcador utilizado 1kb DNA Ladder**



**Figura 3.2.3.1.** Perfis de DNA dos isolados de rizóbios obtidos das raízes de feijoeiro dos vários tratamentos do ensaio. Marcador utilizado 1kb DNA Ladder.

Foi construído um dendrograma com base nos dados obtidos que serviu para interpretar a proximidade genética entre os vários isolados de rizóbio, apresentado na Figura 3.2.3.2.



**Figura 3.2.3.2. Dendrograma de similaridades genética construído com base nos perfis de DNA de 24 estirpes de rizóbios isoladas das raízes de feijoeiro do ensaio em estufa.**

Não é aparente um agrupamento de acordo com o tratamento de origem dos isolados, muito embora as duas clades representadas no topo do dendrograma pareçam associar sistemas radiculares de cv. Fasili e de cv. Oriente. É importante aqui sublinhar que não pareceu haver uma separação entre os tratamentos de plantas enxertadas em si próprias ou normais. Os isolados obtidos das raízes de plantas da cv. Feijão de 7 anos (*P. coccineus*), pertencentes a uma espécie de feijoeiro diferente da das cvs. Fasili e Oriente (*P. vulgaris*) não se agruparam na mesma clade.

### 3.3. Incidência e severidade de suberose radicular (*Pyrenochaeta lycopersici*).

A avaliação dos efeitos provocados pela *P. lycopersici*, só foram analisados nas raízes das plantas de feijoeiro da amostragem final. Analisando a figura 3.3., nota-se que em todos os tratamentos se detetou infecção pelo fungo encontrando-se os índices de suberose radicular entre os valores 1 e 5. A severidade de sintomas de suberose radicular dependeu do tratamento do ensaio ( $P=0.024$ ). As plantas analisadas do tratamento OO tinham sintomas significativamente mais leves, e em média, abaixo do índice de suberose radicular 2. Em média, os sintomas mais graves foram produzidos em plantas do tratamento OP2. Quando enxertadas, quer em P1 quer em P2, as plantas da cv. Oriente manifestaram sintomas significativamente mais graves da doença, comparativamente com o tratamento OO. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos de plantas enxertadas em P1 e em P2 (FP1, FP2, OP1 e OP2). Também não foram registados índices de severidade estatisticamente diferentes, em média, entre plantas normais ou enxertadas em si próprias de cada cultivar.

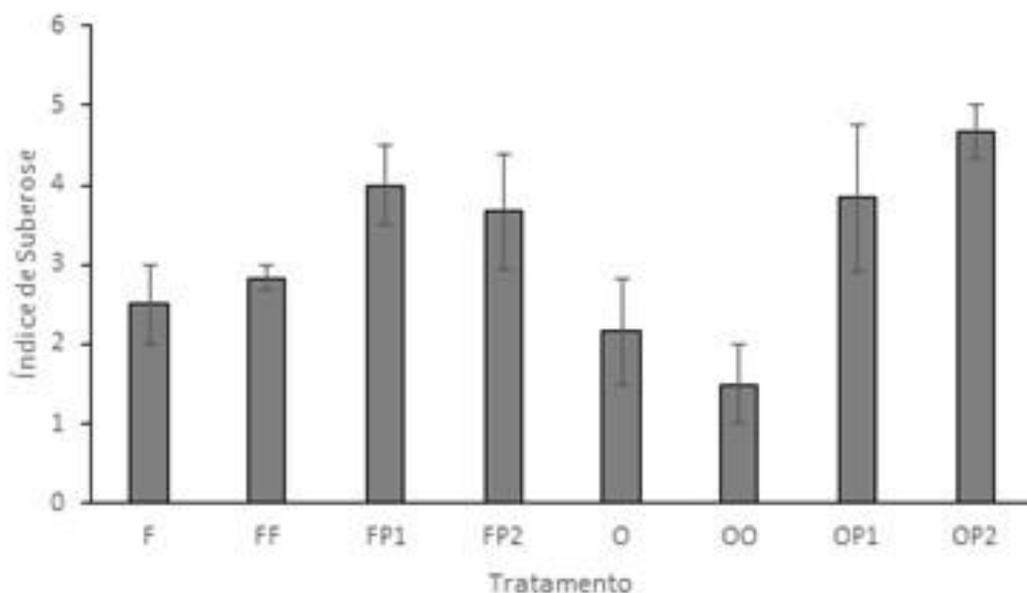
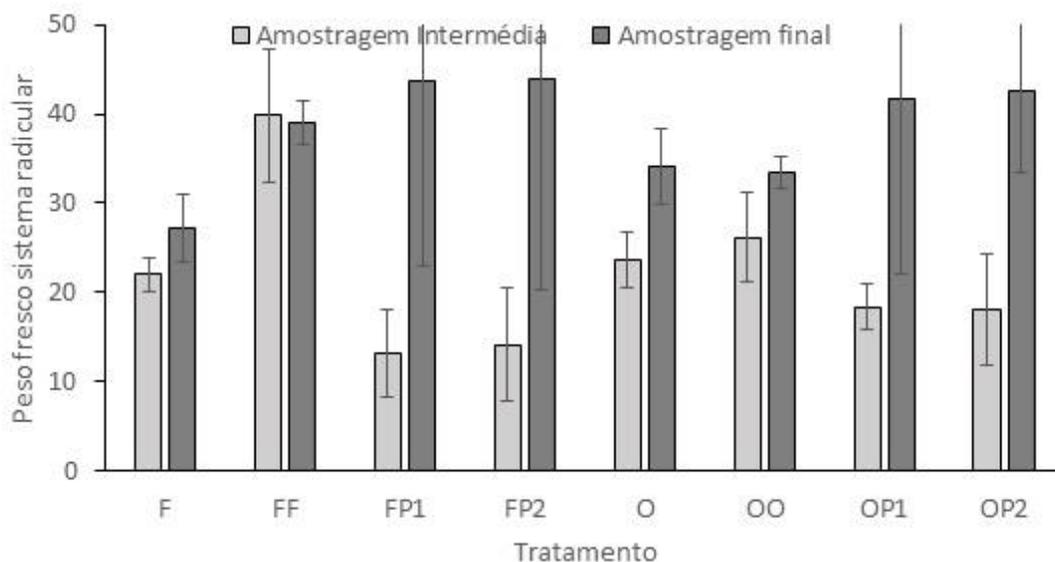


Figura 3.3. Nível de Suberose identificado por sistema radicular de feijoeiro na amostragem final dos tratamentos do ensaio F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; FP1- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P1; FP2- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P2; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria; OP1- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P1; OP2- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P2. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

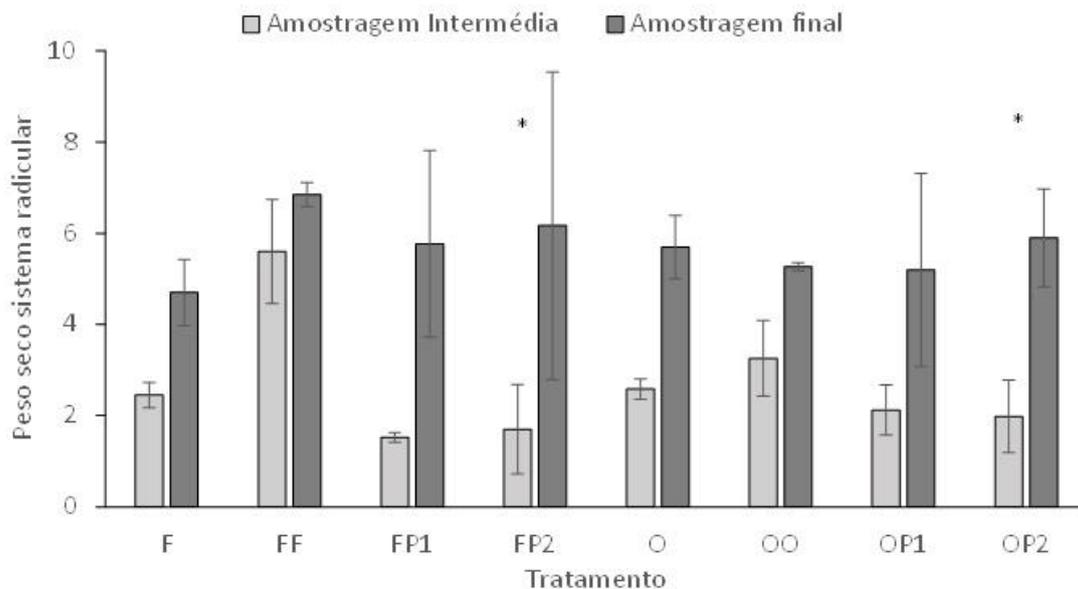
### 3.4. Peso fresco e peso seco das raízes de feijoeiro

Realizou-se a determinação do peso fresco e seco do sistema radicular das plantas do feijoeiro das amostragens intermédia e final e verificou-se que no que diz respeito ao peso fresco houve um aumento em todos os tratamentos exceto no tratamento FF, onde se verificou um ligeiro decréscimo de peso. A diferença de peso maior foi sentida nos tratamentos FP1 e FP2.



**Figura 3.4.** Peso fresco da parte radicular do feijoeiro nas amostragens intermédia e final dos tratamentos do ensaio F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; FP1- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P1; FP2- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P2; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria; OP1- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P1; OP2- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P2. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.

Quanto ao peso seco registou-se um aumento em todos os tratamentos desde a amostragem intermédia para a final, sendo que as maiores diferenças de peso foram verificadas também nos tratamentos FP1 e FP2.



**Figura 3.4.1. Peso seco da parte radicular do feijoeiro nas amostragens intermédia e final dos tratamentos do ensaio F- cv. Fasili; FF- cv. Fasili enxertada em si própria; FP1- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P1; FP2- cv. Fasili enxertada no porta-enxerto P2; O- cv. Oriente; OO- cv. Oriente enxertada em si própria; OP1- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P1; OP2- cv. Oriente enxertada no porta-enxerto P2. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão de 3 repetições.**

#### 4. Discussão e conclusão

Os patogêneos do solo, herbívoros e mutualistas, que parasitam plantas, influenciam a performance e a habilidade competitiva das espécies de plantas e da sua descendência. Por sua vez, as plantas também afetam seletivamente as comunidades biológicas do solo associados à sua rizosfera e, como consequência, interações de feedback são estabelecidas entre as plantas e os microrganismos do solo. Estas interações são cruciais no tempo e no espaço para a composição natural da comunidade de plantas. Os feedbacks podem alterar a dependência das interações multitróficas entre organismos da rizosfera. Contudo as interações entre mais do que um grupo de organismos do solo tem sido ignorados nos estudos da ecologia (Penã, et al., 2005).

Apesar de serem funcionalmente distintos, os nódulos de rizóbio, as galhas de nemátodes e os sítios de alimentação, compartilham várias características anatômicas e morfológicas. Considerando simultaneamente as evidências fisiológicas, celulares e moleculares, há indicações que essas interações parasitárias e simbióticas são muito parecidas e, às vezes, o seu limite muito ténue, justamente porque são orquestradas por genes quase idênticos, que provavelmente compartilham a mesma origem evolutiva (Junior & Fragoso, 2008).

Os resultados do presente trabalho mostram que o estudo dos nemátodes fitoparasitas presentes nas suspensões do solo permitiram, identificar um total de sete gêneros de nemátodes fitoparasitas nos vários tratamentos e datas de amostragem do ensaio: os ectoparasitas *Helicotylenchus*, *Paratylenchus*, *Rotylenchus*, *Tylenchorhynchus* e *Xiphinema*; e os endoparasitas *Meloidogyne* e *Pratylenchus*. Ao longo das datas de amostragem o número e nemátodes variou de acordo com a espécie e com a combinação porta-enxerto/cultivar enxertada, indicando comportamentos diferenciados ao nível da sobrevivência dos nemátodes no solo. Os resultados obtidos permitem concluir que os talhões que apresentaram maior número de nemátodes fitoparasitas, no solo, no início da cultura foram os pertencentes ao tratamento F (203). No final da cultura, o maior número de nemátodes fitoparasitas foi observado no tratamento OO. Conclui-se ainda que a maior diferença entre a população de nemátodes no início e no final da cultura, foi registado no tratamento OO.

Os gêneros de endoparasitas *Pratylenchus* e *Meloidogyne* existiam no solo da estufa, tanto no início da cultura como no final, em todos os tratamentos (F, FF, O e OO). No início da cultura, o género *Pratylenchus*, apareceu em grande quantidade associado ao tratamento F e em menor quantidade no tratamento O. Quanto ao género

*Meloidogyne* foi encontrado em maior quantidade associado às plantas do tratamento F e em menor quantidade no tratamento FF. No que se refere ao final da cultura, nemátodes do género *Pratylenchus* foram encontrados em maior quantidade no tratamento O e em menor quantidade no tratamento F. Para o género *Meloidogyne* verificou-se uma maior quantidade nos tratamentos F e OO e menor quantidade no tratamento FF.

No género *Rotylenchus* verificou-se um aumento do número de nemátodes nos tratamentos FF e O do início para o final da cultura. A maior diferença ocorreu na cultivar Oriente não enxertada. O número de nemátodes diminuiu nos tratamentos F e OO, sendo a maior diferença registada na cultivar Fasili não enxertada.

O uso de porta-enxertos resistentes será uma das medidas mais eficiente para o controlo de nemátodes fitoparasitas, pois evita o aumento das populações dos mesmos, que por sua vez baixa o custo da produção (Somavilha et al., 2012).

O estudo dos efeitos da enxertia de duas cultivares de feijão-verde nas populações de nemátodes fitoparasitas nas raízes de feijoeiro permitem concluir que para o género *Meloidogyne* verificou-se que da amostragem intermédia para a final houve um aumento no número de nemátodes nos tratamentos F, FF, FP2 e O. No tratamento OP1 o número manteve-se aproximadamente constante e notou-se uma diminuição nos tratamentos FP1, OO e OP2, sendo que a maior ocorreu no tratamento OO. Estas diferenças não foram contudo estatisticamente significativas. No que respeita ao número de massas de ovos e de ovos de *Meloidogyne* spp., só foram detetadas duas massas de ovos na amostragem intermédia no tratamento OO, onde não foram encontrados ovos. Na amostragem final foram encontradas massas de ovos e ovos nos quatro tratamentos (F, FF, O e OO), sendo que o maior número de ovos foi detetado nas raízes de feijoeiro cvs. Fasili e Oriente não enxertadas.

Os resultados obtidos permitem concluir que, não foram detetados nemátodes do género *Pratylenchus* nas raízes das plantas de feijoeiro da amostragem intermédia. O mesmo não se verificou na amostragem final, onde foram encontrados nemátodes deste género nos tratamentos F, O e OO. A cultivar onde foi encontrado o maior número de nemátodes deste género foi na cultivar Oriente. Na cultivar Fasili enxertada em Fasili não houve registo de nemátodes deste género, e desta forma este tratamento (FF) será o mais indicado para evitar os danos provocados por *Pratylenchus* na cultura do feijão - verde.

Os resultados dos efeitos da enxertia de duas cultivares de feijão-verde na incidência da doença da suberose radicular causada pelo fungo *Pyrenochaeta lycopersici* permitem concluir que o índice de infecção mais elevado (4/5) registou-se nos tratamentos onde foram utilizados os porta-enxertos P1 e P2 (FP1, FP2, OP1 e OP2). O maior índice da doença, nível 5, ocorreu no porta enxerto P2 enxertado com a cultivar Oriente, e o menor índice da doença foi registado na cultivar Oriente enxertada em Oriente. Na cultivar Fasili, o índice de infecção, nos tratamentos FF, FP1 e FP2 foi mais elevado do que no tratamento F. Desta forma, pode-se afirmar que a cultivar Fasili enxertada em si própria e nos porta-enxertos P1 e P2 é mais susceptível à infecção pelo fungo. Quanto à cultivar Oriente, verificou-se que em relação ao tratamento O, os tratamentos OP1 e OP2 registaram um índice de infecção mais elevado e o tratamento OO um índice menor.

Os resultados dos efeitos da enxertia de duas cultivares de feijão-verde na incidência na nodulação de raízes de feijão por rizóbio, e considerando as duas amostragens de raízes efetuadas, intermédia e final, permitem concluir que se registou uma redução do número nódulos de rizóbio por raiz em todos os tratamentos (F, FF, FP1, FP2, O, OO, OP1, OP2) na amostragem de raízes realizada no fim da cultura, em Agosto. No tratamento OP2 as diferenças entre o número e nódulos registados nas duas épocas foram significativas. Santos et al. (2012) referiu que na presença de nemátodes fitoparasitas, a nodulação pode ser inibida ou inclusive cessar. No que se refere às características das colónias de rizóbio isoladas, todas apresentaram uma cor branca mucóide (Araújo, 1994). A maioria das estirpes caracteriza-se por apresentar crescimento rápido, e acidificação do meio de cultura. Apenas três isolados obtidos das raízes dos tratamentos FFR1I, OR1G2 e OOR3 apresentaram um crescimento lento, e alcalinização do meio de cultura.

A análise do dendograma que traduz a similaridade genética dos isolados obtidos, mostra que existe alguma similaridade genética entre as várias estirpes de rizóbio. Esta similaridade é mais evidente nas estirpes isoladas das raízes das plantas da cultivar Oriente não enxertada e das de Oriente enxertada em Oriente (OOR1C, OR3M2, OR3F2, OOR2G, OR2A2, OR2B2, OOR2I2) e também no caso das estirpes isoladas das raízes das plantas da cultivar Fasili não enxertada e das de Fasili enxertada em Fasili (FR1J1, FFR2C, FFR1I, FR3B e F7D).

Conclui-se ainda que as populações naturais de nemátodes, rizóbio e *P. Lycopersici* presentes no solo infetaram as raízes dos porta-enxertos em estudo.

Nenhum dos tratamentos realizados (porta-enxerto/cultivar enxertada) mostrou ser simultaneamente resistente aos nemátodes dos géneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus*. O tratamento que conduziu a melhores resultados contra *Meloidogyne* spp. e *P. lycopersici*, foi o tratamento OO (Oriente enxertado em Oriente), a cultivar Oriente foi já previamente identificada como tendo um grau de resistência a este género de nemátodes fitoparasitas (Pires et al. 2016). Para o género *Pratylenchus* o tratamento com melhores resultados foi o FF (Fasili enxertado em Fasili). Ainda relativamente à enxertia das cultivares Fasili e Oriente, referente ao nemátode *Tylenchorhynchus* spp. esta não é benéfica para este género de nemátodes verificando-se um aumento significativo no tratamento FF.

No que diz respeito à infeção por rizóbio não pareceu haver uma separação entre os tratamentos de plantas enxertadas em si próprias ou as plantas não enxertadas. A análise da diversidade genética dos isolados de rizóbio obtidos das raízes de plantas da cv. Feijão de 7 anos (*P. coccineus*), uma espécie de feijoeiro diferente das cvs. Fasili e Oriente (*P. vulgaris*), mostrou que as bactérias que infetaram estas duas espécies de feijão são diferentes, e não ficaram agrupadas no mesmo grupo.

Apesar de no final da cultura se ter verificado menor número de nódulos de rizóbio, infeção por nemátodes e suberose radicular, estes factos não provocaram diferenças notáveis no peso fresco e seco das raízes dos porta-enxertos utilizados.

Em suma, a enxertia por si só poderá não promover um controlo simultâneo das várias doenças que afetam o feijoeiro, uma vez que diferentes cultivares apresentam reações hospedeiras diferentes para essas doenças. Embora tenha havido uma tendência para um menor número de galhas de *Meloidogyne* formadas nas raízes de plantas enxertadas em P1 e em P2, esta diferença não foi significativa. Uma interpretação mais cuidada dos resultados obtidos com nemátodes presentes na rizosfera dos vários tratamentos foi, no entanto, comprometida pelas condições de stress hídrico no ensaio. Futuramente deverá ser elucidada a interação dos vários géneros de nemátodes fitoparasitas presentes no solo com as plantas de feijoeiro.

É também importante realçar que não houve, nos tratamentos avaliados, uma combinação enxerto porta-enxerto com sucesso para todas as doenças em estudo. Plantas enxertadas na mesma cultivar (OO e FF) pareceram apresentar menores níveis de suberose radicular mas maior número de galhas provocadas por nemátodes do que plantas enxertadas nas linhagens de porta-enxertos em desenvolvimento. É portanto necessário continuar a desenvolver investigação no sentido de encontrar porta-enxertos

que conjuguem maiores níveis de resistência às doenças que mais afetam o feijoeiro com uma produção desejável.

## 5. Referências Bibliográficas

- Abad, P., Castagnone-Sereno, P., Rosso M., Engler, J.A., Favery B. (2009). Capítulo 7- Invasion, Feeding and Development. Root-knot Nematodes / edited by Roland N. Perry, Maurice Moens, and James L. Starr. CAB International.
- Afonso, S. M. (2010). Caracterização Físico-Química e Actividade Antioxidante de Novas Variedades de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Biblioteca Digital do Instituto Politécnico de Bragança:  
<https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/4083>.
- Almeida, D. (2006). Feijão-verde e outros *Phaseolus*. In D. Almeida, Manual de Culturas Hortícolas (Vol. II, pp. 247-270). Lisboa: Editorial Presença.
- Angioi, S. A., Rau, D., Attene, G., Nanni, L., Bellucci, E., Logozzo, G., Negri, V., Spagnoletti, Z.P.L. & Papa, R. (2010). Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. Theor Appl Genet. 121(5):829-43.
- Aragona, M., Minio, A., Ferrarini, A., Valente, M. T., Bagnaresi, P., Orrù, L., Tonon, P., Zamperin, G., Infantino, A., Valè, G., Cattivelli, L., Delledonne, M. (2014). De novo genome assembly of the soil-borne fungus and tomato pathogen *Pyrenochaeta lycopersici*. BMC Genomics.
- Araújo, R. S., Hungria, M. (1994). Microrganismos de importância Agrícola- Fixação Biológica de Nitrogénio em Feijão. Embrapa.
- Araújo, R. S. (1994). Caracterização Morfológica, Fisiológica e Bioquímica do Rizóbio. pp. 157-170.
- Barney, B.M., Lee, H.I., dos Santos, P.C., Hoffman, B.M., Dean, D.R., Seefeldt, L.C. (2006).

- Biederbeck, V.O., Zentner, R.P., Campbell, C.A. (2005). Soil microbial populations and activities as influenced by legume green fallow in a semiarid climate. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1775–1784.
- Bochow, H. (1989). Use of microbial antagonists to control soil borne pathogens in greenhouse crops. *Acta Horticulturae* No. 255, 271-280.
- Bongers, T., Bongers, M. (1997). Funcional diversity of nematodes. *Applied Soil Ecology*.
- Bridge, J., & Page, S. L. (1980). Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. *Tropical Pest Management*. 26, 296–298. pp.59.
- Brito, L. F., Pacheco, R. S, Souza Filho, B. F., Brito Ferreira, E. P., Straliootto, R., Araújo, A. P. (2015). Resposta do Feijoeiro Comum à Inoculação com Rizóbio e Suplementação com Nitrogênio Mineral em Dois Biomas Brasileiros. *Divisão 2 - Processos e propriedades do solo. Comissão 2.1 - Biologia do solo*. pp. 982.
- Buchanan, R.E. (1980). Approved lists of bacterial names. In: Skerman, V. B. D.; McGowan, C. & Sneath, P.H.A. *Int. J Syst Bacteriol*. pp. 225-240.
- Castagnone- Sereno, P., Danchin, E., Perfus-Barbeoch, L., Abad, P. (2013). Diversity and Evolution of Root-Knot Nematodes, Genus *Meloidogyne* : New insight from the Genomic Era. *Annual Reviews*.
- Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G. (2014). Parasitic success without sex: the nematode experience. *Journal of Evolutionary Biology* 27, 1323-1333.
- Clergeot, P., Schuler, H., Mørtz, E., Brus, M., Vintila, S., Ekengren, S (2012). The Corky Root Rot Pathogen *Pyrenochaeta lycopersici* Secretes a Proteinaceous Inducer of Cell Death Affecting Host Plants Differentially. *The American Phytopathological Society*.

- Costa, S. R. (2014). Ecologia de nemátodes e seu interesse na enxertia de plantas hortícolas (Parte I e II). *Agrotec.* pp. 38-41.
- Costa, S.R., Martins, M.F., Mourão, I., Moura, L. (2016). Avaliação da resistência de linhagens de feijoeiro ao nematode *Meloidogyne javanica* e ao fungo *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli*. . IV Colóquio Nacional de Horticultura Biológica. Atas Portuguesas de Horticultura, 25: 143-149.
- Coyne, D.L., Nicol, J.M., Claudius-Cole, B. (2007). Nematologia prática: Um guia de campo e de laboratório. SP-IPM secretariat. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin.
- Curtis, R. H.C., Robinson, A. F., Perry, R. (2009). Capítulo 6- Hatch and Host Location. Root-knot Nematodes / edited by Roland N. Perry, Maurice Moens, and James L. Starr. CAB International.
- Danchin, E.G.J., Rosso, M.N. (2012). Lateral gene transfers have polished animal genomes: lessons from nematodes. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 10.3389/fcimb.2012.00027
- Debouck, D., & Hidalgo, R. (1984). Morfologia de la planta de frijol comun (*Phaseolus vulgaris L.*). Colômbia: Publications Series 04SB-09.01. CIAT,AA 67-13, Cali.
- D’Haeze, W. & Holsters, M. (2002). Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* 12: 79R-105R.
- Ebben, M.H. (1974). Brown root rot of tomato. Report Glasshouse Crops Reserarch Institute, pp. 127 -135, Littlehampton.
- Eisenback, J.D. (1985). Detailed Morphology and Anatomy of Second-Stage Juveniles, Males, and Females of the Genus *Meloidogyne* (Root-Knot Nematodes). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Volume I: Biology and Control. A Cooperative Publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development. Edited by J. N. Sasser & C. C. Carter. pp.47

- Eisenback, J. D. and Hunt, D. J. (2009). Capítulo 2- General Morphology. Root-knot Nematodes / edited by Roland N. Perry, Maurice Moens, and James L. Starr. CAB International.
- FAO (1994). Definição e classificação dos produtos: 4. Leguminosas secas e produtos derivados. (Acedido 04/08/2016). [www.fao.org/es/faodef/fdef04e.htm](http://www.fao.org/es/faodef/fdef04e.htm)
- FAO (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat3.fao.org>: Acedido a Outubro, 2015 - Últimos dados estatísticos disponíveis.
- FLF. (2010). Frutas Legumes e Flores. Plantas enxertadas relação feijão no solo. pp. 55.
- Fernandes, J. R. C., Rodrigues, P. (2014). Importância da inoculação com bactérias *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* na produção de leguminosas e o uso do azoto. Hortofruticultura & Floricultura.
- Ferreira, A., Arf, O., Carvalho, M., Araújo, R., Sá, M., Buzetti, S. (2002) Estirpes de *Rhizobium Troopici* na inoculação do feijoeiro. Scientia Agricola.
- Ferreira, R.D.S. (2015). Avaliação da produtividade e qualidade de duas cultivares de feijão-verde enxertadas em dois porta-enxertos. Trabalho Final de Curso de Engenharia Agronómica – Ramo de Espaços-Verdes. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Viana do Castelo. pp.68.
- Ferreira, A. L. (2015). Estudo de Cultivares de Feijão (*Phaseolus coccineus L.*) como Potenciais Porta-enxertos na Cultura de Feijão-verde (*Phaseolus vulgaris L.*). Dissertação de mestrado em Agricultura Biológica. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Viana do Castelo. pp.56.
- Fiume, F., Fiume, G. (2003). Use of Culture Filtrates of *Pyrenochaeta Lycopersici* in Tests for Selecting Tolerant varieties of Tomato. Journal of Plant Pathology. Edizioni ETS Pisa.

- Forsberg, A-S., Sahlström, K. & Ögren, E. (1999). Rotröteproblem i ekologisk odling. Jordbruksinforamtion 12. Jordbruksverket, Sweden
- Frame, J. (2005). Forage legumes for temperate grasslands. Science Publishers, Inc., Enfield, USA and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Fred, E.B., Baldwin, I.L. & McCoy, E. (1932). Root nodule bacteria and leguminous plants. UWMadison Libraries Parallel Press.
- <http://digicoll.library.wisc.edu/cgi-bin/HistSciTech/HistSciTechidx?type=header&id=HistSciTech.RootNodule&isize=M>
- Garrity, G., Bell, J. & Lilburn, T. (2005). Class I. Alphaproteobacteria class. nov. In: Brenner, D. et al. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer, New York, vol. 2, part C. pp. 1- 574.
- Golzar, H. (2009). First report of *Pyrenochaeta lycopersici*, causal agent of tomato corky root rot in Australia. Australasian Plant Disease Notes. Csiro Publishing.
- Gundy, S., D., V. (1985). Ecology of Meloidogyne spp.- Emphasis on Environmental Factors Affecting Survival and Pathogenicity. An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Volume I: Biology and Control. A Cooperative Publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development. Edited by J. N. Sasser and C. C. Carter. pp. 177.
- Hartman, K. (1983). Enhancement technique for egg masses of the root-knot nematode with phloxine B, p.130. In Proc. Third Res. & Plann. Conf. On Root-knot Nematodes, *Meloidogyne* spp., March 22-26, 1982, ed Carter,C. C., International Meloidogyne Project, Lima, Peru. pp. 233.
- Hasna, M. K. (2007). Corky Root Disease Management in Organic Tomato Production. Composts, Fungivorous Nematodes and Grower Participation. Swedish University of Agricultural Sciences. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae.

- Haukka, K., Lindström, K., Young, J.P. (1998). Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Applied and Environmental Microbiology* 64. 419-426.
- Hirschmann, H., (1985). The Classification of the Family Meloidogynidae. An Advanced Treatise on Meloidogyne. Volume I: Biology and Control. A Cooperative Publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development. Edited by J. N. Sasser and C. C. Carter. pp.35
- Hungria, M. (1992). Estudos sobre a associação Rizóbio-Leguminosa- parte II. Capítulo 2- Coleta de nódulos e isolamento de Rizóbio. In: Hungria, M & Araújo, R.S. pp. 45-59.
- Hungria, M., Araújo, R. (1994) Manual de Métodos Empregados em estudos de Microbiologia agrícola Coleta de Nódulos e Isolamento de Rizóbio. Estudos sobre a associação rizóbio-leguminosas (parte II), capítulo 2- coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. Embrapa.
- Hunt, D. J. and Handoo, Z. A. (2009). Capítulo 3- Taxonomy, Identification and Principal Species. Root-knot Nematodes / edited by Roland N. Perry, Maurice Moens, and James L. Starr. CAB International.
- Hussey, R. S., & Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57, 1025–1028. pp.60.
- Hussey, R. S. (1985). Host-Parasite Relationships and associated Physiological Changes. An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Volume I: Biology and Control. A Cooperative Publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development. Edited by J. N. Sasser and C. C. Carter. pp.143.

INE. (2014). Produção das principais culturas agrícolas (t) por Localização geográfica (NUTS - 2002) e Espécie. Obtido em Outubro de 2014, de Instituto Nacional de Estatística:

[http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0000020&contexto=bd&selTab=tab2](http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000020&contexto=bd&selTab=tab2)

Jaouannet, M., Perfus-Barbeoch, L., Deleury, E., Magliano, M., Engler, G., Vieira, P., Danchin, E., Rocha, M., Coquillard, P., Abad, P., Rosso, M. (2012). A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant cells and targeted to the nuclei. *New Phytologist*.

Jones J. T., Haegeman A, Danchin E. G., Gaur H. S., Helder J, Jones M. G., Kikuchi T, Manzanilla-López R, Palomares-Rius J. E., Wesemael W. M., Perry R. N. (2013) . Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14. 946-961.

Junior, F., Fragoso, R. (2008). Quais segredos rizóbios, agrobactérias e fitonematóides têm em comum? Embrapa Cerrados.

Junior, M. (2009) Avaliação da capacidade reprodutiva de populações de *Pratylenchus* spp. frente a diferentes espécies vegetais. Escola Superior de Agricultura “Luz de Queiroz”.

Kreuter, M. (2012). Horticultura Biológica para Principiantes. Conhecimentos Básicos e Prática. Editorial Presença.

Kukenthal, W., Matthes, E., Renner, M. (1986) Guia de Trabalhos de Zoologia. pp 152, 153 e 154. Livraria Almedina.

LeBoeuf, J., Traquair, J., Trueman, C. (2010). Disease Update: Tomato corky root and vine decline. Infosheet.

- Lemaire, J.M., Glandard, A., Cesar, G., Ferriere, H. (1992). Le corky-root de la laitue, maladie nouvelle en France. PHM Revue Horticole (328), 39-42.
- Lindström, K. & Mousavi, S.A. (2010). Rhizobium and other N-fixing symbioses. In: Encyclopedia of life science (eLS), John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Lindström, K., Amsalu Aserse, A. & Mousavi, S.A. (2015). Evolution and taxonomy of nitrogen-fixing organisms with emphasis on rhizobia. Biological Nitrogen Fixation. John Wiley & Sons, Inc. pp. 21-38.
- Löhis, F. and Hansen, R. (1921). Nodulating bacteria of leguminous plant. J. Agric. Res. 20: 543-556.
- Lopes, E. C. P., Moraes, A., Lang, C. R. (2016). Estudo do fracionamento isotópico de nitrogênio aplicado à gramíneas e leguminosas forrageiras. Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science, Guarapuava-PR, v.9, n.1. pp.121-130.
- Mai, W. F. (1985). Plant-Parasitic Nematodes: Their Threat to Agriculture. An Advanced Treatise on Meloidogyne. Volume I: Biology and Control. A Cooperative Publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development. Edited by J. N. Sasser and C. C. Carter. pp.15-21.
- Marques, A., Opitz, L., Afonso, M., Leite, E., Pacheco, J., Sousa, P., Pacheco, R. (2002). Horticultura Manual do Formando. Agricultura para o futuro. Marquifor.
- Masheva, S., Tringovska, I., Lazarova, T., Ganeva, D. (2014). Possibilities for Control of Corky Root (*Pyrenochaeta lycopersici* Schn., Gerl.) in Tomato Grown in Cultivation Facilities. Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences Special Issue: 2.
- Mihira T., Takeuchi T., Fukuda H., Kawakami T., Yamamoto F. (1999). Physical control of southern root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* and brown root

rot caused by *Pyrenochaeta lycopersici* by the combination of root restriction and soil solarization on tomato in plastic greenhouse. Annual Report of the Kanto-Tosan Plant Protection Society 46: 145-148.

Milc, J., Infantino, A., Pecchioni, N. Aragona, M. (2012). Identification of tomato genes differentially expressed during compatible interaction with *Pyrenochaeta lycopersici*. Journal of Plant Pathology), 94 (2), 283-296.

Mitkowski, N.A., G.S. Abawi. (2003). Nematode das galhas. (Portuguese translation by E.A, Lopes, R. Dallemole-Giaretta, and B.S.Vieira, 2011. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2011-03-29-01 Revised 2011.

Moens, M., Perry, R. N., Starr, J. L. (2009). Capítulo1- Meloidogyne Species – a Diverse Group of Novel and Important Plant Parasites. Root-knot Nematodes / edited by Roland N. Perry, Maurice Moens, and James L. Starr. CAB International.

Moura M. (1993). Solarização do Solo em Estufa na Região de Entre Douro e Minho. Acção sobre Patogéneos do Solo e efeitos na Produção de Culturas Hortícolas. Tese de Mestrado em Protecção Integrada, ISA/UTL. pp. 134.

Moura, M.L.R. & Palminha, J. (1994). A non-chemical method for the control of *Pyrenochaeta lycopersici* of tomato in the north of Portugal. Acta Horticulturae 366, 317-321. pp. 64.

Moura, L., Queiroz, I., Mourão, I., Brito, L.M. and Duclos, J. (2012). Effectiveness of soil solarization and biofumigation for the control of corky root and root-knot nematode *Meloidogyne* spp. on tomato. Acta Hort. 933, 399-405.

Mourão, I., Araújo, J., Brito, M. (2012). Manual de Agricultura Biológica- Terras de Bouro. Camara Municipal de Terras de Bouro. pp. 43- 50.

Mourão, I. M., Brito, L. M. (2014). A Enxertia em Culturas Hortícolas. Agotec. pp. 53-56.

- Mullin, B. A., Abawi, G. S., Pastor-Corrales, M. A., & Kornegay, J. L. (1991). Contribution of Root and Shoot Tissues of *Phaseolus vulgaris* to *Meloidogyne incognita* Resistance. Hortscience. pp. 1503-1504.
- Nulik, J; Dalgliesh, N; Cox, K.; and Gabb, S. (2013). Integrating herbaceous legumes into crop and livestock systems in eastern Indonesia. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), Canberra, Australia.
- Okazaki S, Nukui N, Sugawara M & Minamisawa K (2004). Rhizobial strategies to enhance symbiotic interaction: rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. Microbes Environment, v. 19. pp. 99-111.
- Oliveira, A. P. S. (2016). Desempenho do feijoeiro-comum Inoculado com rizóbio em resposta a diferentes plantas de cobertura e épocas de dessecação. Universidade Federal de Goiás. Escola de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em agronomia.
- Onkendi, E. M. (2012). Molecular characterization of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) parasitizing potatoes (*Solanum tuberosum*) in South Africa. Department of microbiology and plant pathology Faculty of agricultural sciences. University of Pretoria.
- Peña, E., Echeverría, S., Putten, W., Freitas, H. and Moens, M. (2005). Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. New Phytologist.
- Pires, D., Costa, S. R., Mourão, I., Almeida, M. T. (2016). Avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus* spp.) a *Meloidogyne javanica*, para uso como porta-enxerto. Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Campus de Gualtar.
- Punithalingam, E., Holliday, P. (1973). *Pyrenochaeta lycopersici*. CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria, nº 398.

- Ribeiro, N. (2009). Avaliação de Espécies Vegetais e Cultivares de Soja para a Composição de Esquemas de Rotação ou Sucessão de Culturas para o manejo de *Pratylenchus brachyuru*. Universidade Estadual de Londrina
- Ribeiro, M.C. (2014). Avaliação da resistência/tolerância de dois porta - enxertos de feijão verde ao nemátode das galhas radiculares *Meloidogyne javanica*. Instituto Politécnico de Viana do Castelo. Escola Superior Agrária de Ponte de Lima
- Ribeiro, R.A., Rogel, M.A., López-López, A., Ormeño-Orrillo, E., Barcellos, F.G., Martínez, J., Thompson, F.L., Martínez-Romero, E. & Hungria, M. (2012). Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 1179-1184.
- Ripado, M.F.B. (1992). O Feijão. Variedades, cultura, produção. Publicações Europa-América, 136p. ISBN: 9789721034792.
- Rodrigues, C. (2009). Plantas hortícolas enxertadas. I Colóquio nacional de Sementes e Viveiros Coimbra, 29 e 30 de Outubro de 2009. Atas Portuguesas de Horticultura nº15.
- Rose, T.J., Hardiputra, B., Rengel, Z. (2010). Wheat, canola and grain legume access to soil phosphorus fractions differs in soils with contrasting phosphorus dynamics. *Plant and Soil* 326: 159–170.
- Santa-Marta, J. (1986). Corky Root of Tomato in Portugal caused by *Pyrenochaeta Lycopersici*. *Acta Horticulturae*, 191, 311-316. Solanacea in Mild Winter.
- Santos, L. N. S., Alves, F.R., Belan, L. L., Cabral, P. D. S., Matta, F. P., Junior, W. C. J., Moraes, W. B. (2012). Damage quantification and reaction of bean genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Meloidogyne incognita* race 3 and *M. javanica*. *Summa Phytopathologica*, v.38, n.1, pp.24-29.

- Schwartz, H.F., Harveson, R.M. (2015). Diseases of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The American Phytopathological Society. Consultado em 04/08/2016. <http://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/Bean.asp>.
- Seyed, A. M. (2016). Revised taxonomy of the family Rhizobiaceae, and phylogeny of mesorhizobia nodulating *Glycyrrhiza* spp. PhD Thesis, University of Helsinki.
- Shishkoff, N., Campbell, R.N. (1990). Survival of *Pyrenochaeta lycopersici* and the Influence of Temperature and Cultivar Resistance on the Development of Corky Root of Tomato. *Plant Disease* 74:11, 889-894.
- Sicard, D., Nanni, L., Porfiri, O., Bulfon, D., Papa, R. (2005). Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. landraces in central Italy. *Plant Breeding* 124, 464-472.
- Silva, M. C. N. (2009). Papel dos ácidos húmicos na mineralização do azoto em solos florestais. Departamento de química. Universidade de Aveiro.
- Soares, A., Ferreira, P., Perreia, J., Vale, H., Lima, A., Andrade, M., Moreira, F., (2006). Eficiência Agronômica de Rizóbios Seleccionados e Diversidade de Populações Nativas Nodulíferas em Perdões (MG). II- Feijoeiro. *R. Bras. Ci. Solo*, 30:803-811.
- Somavilha, L., Gomes, C.B., Quecini, V.M. (2012). Registo da ocorrência de *Meloidogyne incógnita* no porta-enxerto “IAC 766- Campinas” no estado de Pernambuco e reacção de porta-enxertos e de cultivares copa de videira a *Meloidogyne* spp. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal-Sp, V.34, nº3, pp. 750-756.
- Sprent, J.I. (2008). 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? *Journal of Experimental Botany* 59: 1081-1084.
- Tarjan et al. (1977), Mai and Mullin (1996) Relationship between nematode assemblages and physical properties across land use types. pp.59.

- Teixeira, J. (2013). Avaliação do Sistema de Condução de Tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) enxertado em cultura protegida na produtividade e qualidade dos frutos. Instituto Politécnico de Viana do Castelo.
- Trudgill, D. L., Blok V. C. (2001). Apomictic, Polyphagous Root-Knot Nematodes: Exceptionally Successful and Damaging Biotrophic Root Pathogens. Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, Scotland DD2 5DA. Annu. Rev. Phytopathol.
- Vaz, F. M. G. B. (2015). Avaliação dos efeitos da enxertia na produtividade e qualidade de duas cultivares de feijão-verde. Trabalho Final de Curso de Engenharia Agronómica – Ramo Espaços Verdes. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Viana do Castelo. pp. 96.
- Veríssimo, A. (2008). Avaliação da comunidade microbiana diazotrófica em solos sob cultura biológica por métodos moleculares. Biologia Marinha, Universidade do Algarve.
- Vincent. (1970). A manual for the Pratical study of Root Nodule Bacteria. Oxford: Blaclhwell Scientific. pp.61.
- Wesemaela, W., Moens, M., (2012). Screening of common bean (*Phaseolus vulgaris*) for resistance against temperate root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Society of Chemical Industry.
- Whipps, J.M. (1987). Effect of media on growth and interaction between a range of soil-borne glasshouse pathogens an antagonistic fungi. New Phytologist 107:1, 127-142.
- Whitehead & Hemming, (1965); adaptado por Abrantes et al., 1976 - A Manual for research on *Verticillium chlamydosporium*: a potential biological control agent for root-knot nematodes. pp.58.

Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-Romero, E., Kerr, A. & Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 89-103.

Zook, D. (2015). Symbiosis—Evolution's Co-Author. In: Gontier, N. (Ed.), *Reticulate Evolution*. Springer International Publishing, Switzerland. pp. 41-80.

# **Anexos**

## A1. Fases do procedimento e resultados observados



Fig. A1.1. Sequência de tabuleiros. Separação da terra; lavagem da raiz em água; contagem do número de galhas e nódulos de rizóbio; secagem da raiz.



Figura A1.2. Nódulos de rizóbio em raízes de feijoeiro



Figura A1.3. Raízes de feijoeiro com galhas



Figura A1.4. Massas de ovos de *Meloidogyne* sp.



Figura A1.5. Raiz com um nódulo de rizóbio e galhas.



Figura A1.6. Massas de ovos de *Meloidogyne* sp.

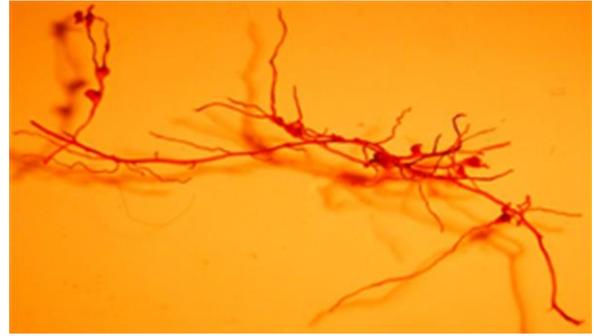


Figura A1.7. Galhas e Nódulos de rizóbio corados com floxina B.



Figura A1.8. Fêmea de *Pratylenchus* sp. observado ao microscópio óptico

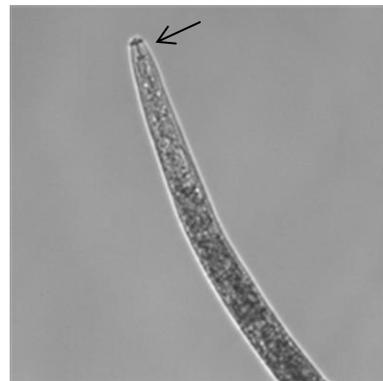


Figura A1.9. Pormenor do estilete de *Pratylenchus* sp.



Figura A1.10. Indivíduo *Aphelenchus* sp. observado ao microscópio óptico (100x)



Figura A1.11. Indivíduo *Aphelenchus* sp. observado ao microscópio óptico (40x)

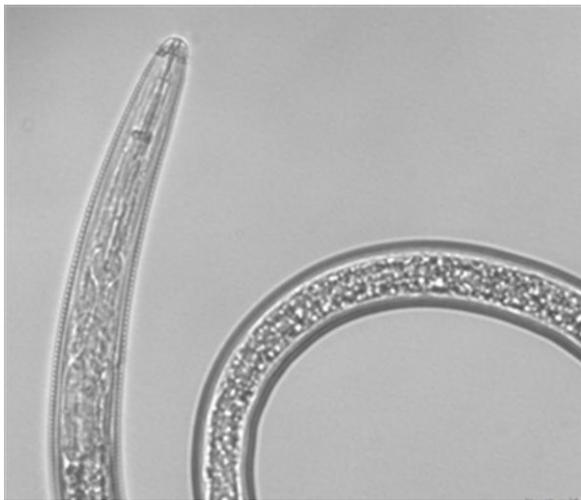


Figura A1.12. Indivíduo *Helicotylenchus* sp. observado ao microscópio ótico (200x).



Figura A1.13. Indivíduo *Helicotylenchus* sp. observado ao microscópio ótico (40x)



Figura A1.14. Indivíduo do género *Meloidogyne* sp. observado ao microscópio ótico (40x)

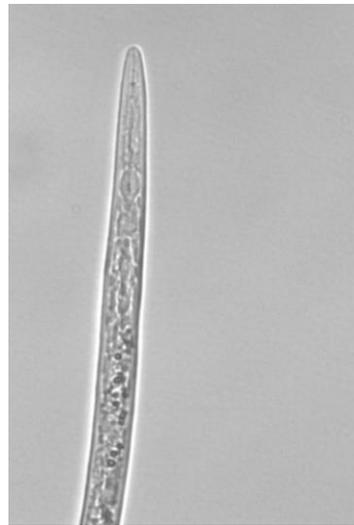


Figura A1.15. Indivíduo *Meloidogyne* sp. observado ao microscópio ótico (100x)

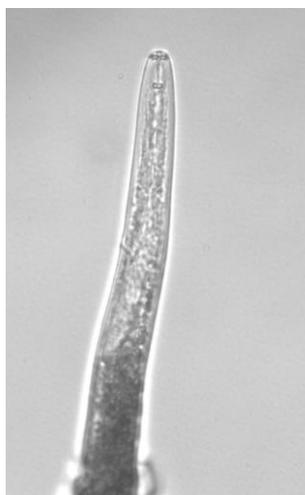


Figura A1.16. Indivíduo *Pratylenchus* sp. observado ao microscópio ótico (100x)



Figura A1.17. Indivíduo *Pratylenchus* sp. observado ao microscópio ótico (40x)



Figura A1.18. Indivíduo *Tylenchorhynchus* sp. observado ao microscópio ótico com (40x)

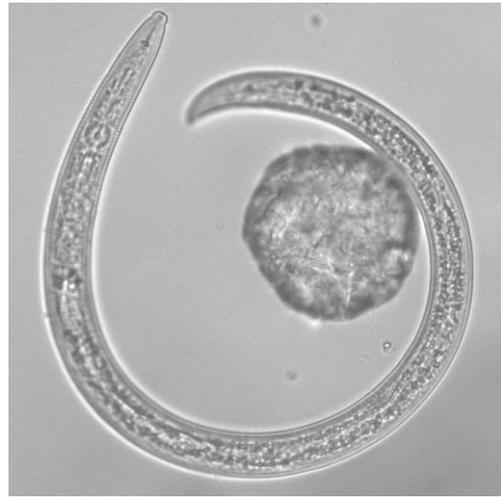


Figura A1.19. Indivíduo *Tylenchorhynchus* sp. observado ao microscópio (100x)



Figura A1.20. Indivíduo *Tylenchorhynchus* sp. observado ao microscópio ótico (40x)

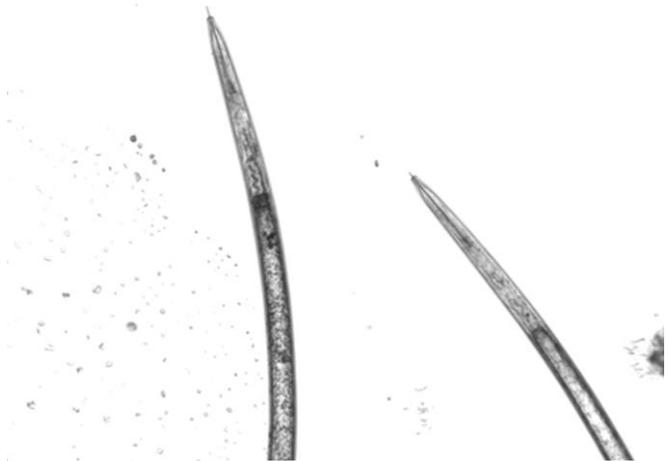


Figura A1.21. Indivíduos *Tylenchorhynchus* sp. observado ao microscópio ótico (200x)

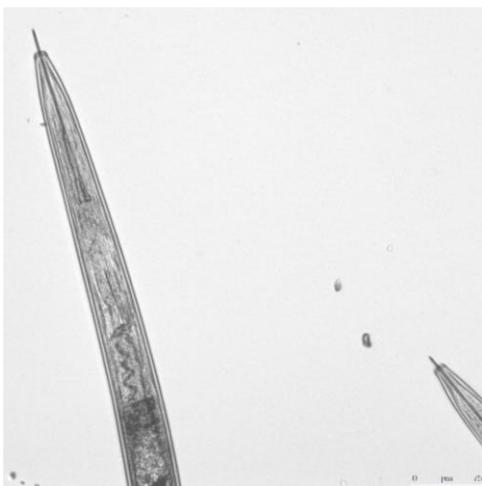


Figura A1.22. Indivíduo *Xiphinema* sp. observado ao microscópio ótico (100x)



Figura A1.23. Fungo *Catenaria* em *Helicotylenchus* sp.

## A2. Tabela de classificação de galhas de *Meloidogyne* sp

explanatory, 0 = no nematodes, 1–4 = galling of secondary roots only, 5–10 = galling of primary laterals and tap root, with 5 equal to 50% of roots galled and 10 the maximum nematode infestation possible. Assessment of galling at the lower end of the scale (0, 1) is always more difficult and time consuming, but can be important in determining if root-knot occurs in the soil at all for future reference.

To obtain accurate results with the chart, the following guidelines should be observed.

1. Only plants which are actively growing should be used to assess root-knot damage. Nematode root galls on senescing plants tend to disintegrate, usually because of secondary infection, leaving behind the steles which can sometimes be mistaken for clean roots.

### Root-knot Rating Chart

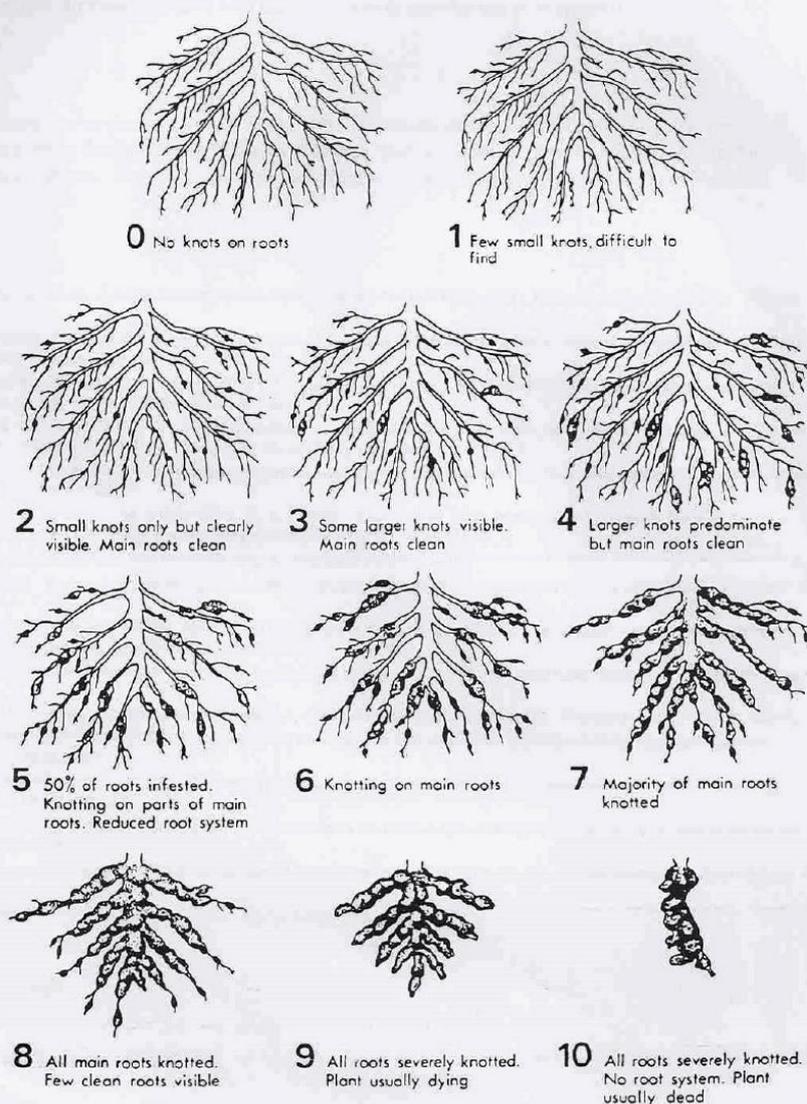


Fig. 1. Root-knot nematode rating chart.

Figura A.2.1. Tabela de classificação de galhas de *Meloidogyne* spp. (Bridge & Page, 1980)

**A3. Morfologia do corpo de *Meloidogyne* (retirado de Hirschmann, 1985)**

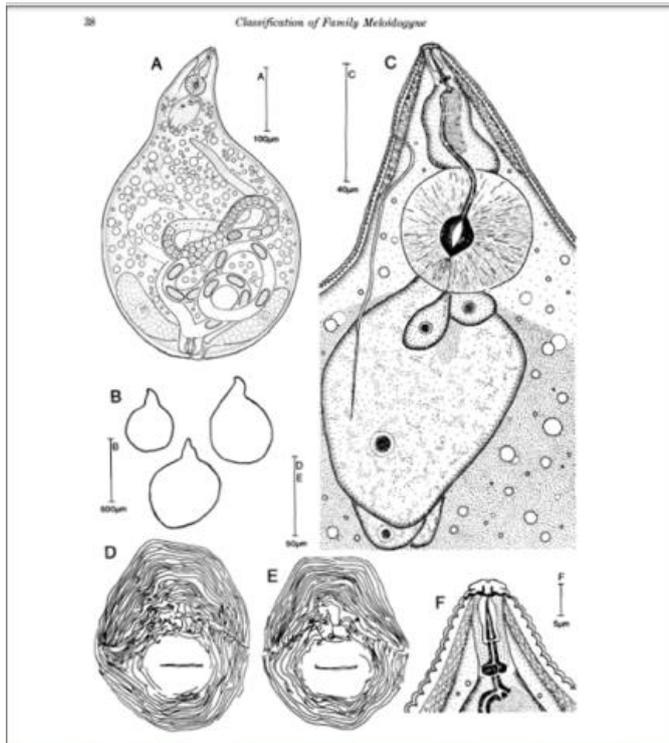


Figura.A3.1. Estrutura do corpo de *Meloidogyne* spp.

**A4. Vários aspetos de *Meloidogyne* spp. (retirado de Hirschmann,1985)**

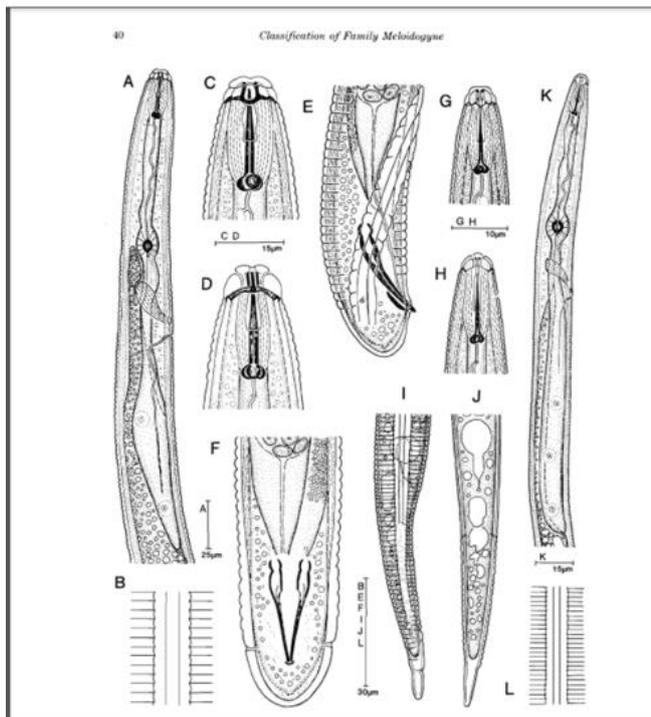


Figura A4.1. Vários aspectos da morfologia de *Meloidogyne* spp.