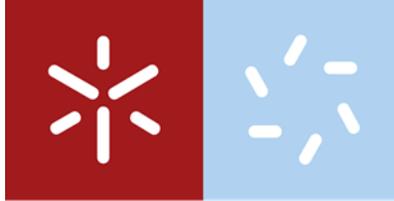


Universidade do Minho  
Escola de Ciências

Paulo Sérgio Santos Lima

**Dinâmica e aquisição de virulência de nemátodes-das-galhas-radiculares do género *Meloidogyne* em porta-enxertos de tomateiro resistentes**





**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Paulo Sérgio Santos Lima

**Dinâmica e aquisição de virulência de nemátodes-das-galhas-radiculares do género *Meloidogyne* em porta-enxertos de tomateiro resistentes**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Ecologia

Trabalho efetuado sob a orientação da:  
**Doutora Sofia Rocha Costa**  
e da  
**Doutora Maria Clara Vieira dos Santos**

## **DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS**

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos de conexos.

## **Agradecimentos**

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo FEDER (Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional) no âmbito do acordo de parceria COMPETE2020 (Programa Operacional Factores de Competitividade) e por fundos nacionais através da FCT-Fundação para Ciência e a Tecnologia, I. P. no âmbito do projeto HANDLER, POCI-01-0145-FEDER-029283 (PTDC/ ASP-PLA/29283/2017).

Agradeço à minha orientadora Doutora Sofia R. Costa por toda atenção, paciência, suporte e confiança para o desenvolvimento deste trabalho.

À Doutora Maria Clara Vieira dos Santos, pelo auxílio de sempre, pelos ensinamentos, disponibilidade e contribuição para o meu crescimento profissional.

À toda equipa do grupo de Nematologia da Universidade do Minho: Professora Doutora Teresa Almeida, Ana Martins, Rui Carvalho, Rita Gonçalves, Manuel Rodrigues, José Fernando e Carolina Duarte, por toda colaboração, receptividade e ajuda e momentos vividos.

Ao Departamento de Biologia – CBMA e seus funcionários, em especial ao Dr. Luís Correia e Dra. Inês Pinheiro, pela ajuda e contribuição.

Um agradecimento as empresas Fitó, Rijk Zwaan e Syngenta pela disponibilidade e fornecimento das sementes das cultivares de porta-enxertos que viabilizaram a realização deste trabalho.

Um agradecimento especial para todos os meus amigos e família pelo encorajamento e apoio. Por fim, e não menos importante, a meus pais, Simone e Paulo, pela incansável ajuda, e minhas irmãs, Camila e Vivianne, por sempre acreditarem em mim, muito obrigado a todos.

## **DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE**

Declaro que o presente estudo foi elaborado respeitando o Código de Conduta da Universidade do Minho. Declaro ter atuado com integridade e confirmo que não foi utilizada quaisquer tipos de falsificação ou plágio de informações. Também assumo seriedade na elaboração, conduta e resultados aqui apresentados.

## **Dinâmica e aquisição de virulência de nemátodes-das-galhas-radiculares do gênero *Meloidogyne* em porta-enxertos de tomateiro resistentes**

### **Resumo**

Os nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR) são fitoparasitas obrigatórios que causam graves prejuízos mundialmente sobretudo em culturas hortícolas. A enxertia de hortícolas em cultivares resistentes tem merecido interesse de investigação como uma prática sustentável de gestão destes nemátodes. As cultivares de porta-enxerto disponíveis comercialmente para tomateiro, um hospedeiro universal de NGR, têm apenas resistência parcial e diferencial para as diferentes espécies dos nemátodes, pelo que podem alterar a sua dinâmica populacional e potenciar o desenvolvimento de populações virulentas. No entanto, não são ainda compreendidos os processos de interação interespecífica de NGR, a sua possível mediação por compostos de comunicação produzidos pelos nemátodes (ascarosídeos) ou emitidos em exsudatos radiculares e os seus efeitos na interação com as plantas hospedeiras. Através de ensaios em vaso e *in vitro* em condições controladas foram avaliadas as interações diretas e indiretas entre populações das quatro espécies mais comuns de NGR na rizosfera de tomateiro. Foram ainda analisados os efeitos de exsudatos radiculares (ER) de diferentes origens (tomateiro suscetível e porta-enxertos) e de *nemawater* (NW), a água condicionada pela libertação de compostos de jovens de segundo estágio (J2), no comportamento, atração e infeção da raiz por NGR. Em vaso, foram detetados efeitos de competição indireta por concorrência, e direta por interferência. Inesperadamente, também foi identificado efeito de facilitação de uma espécie sobre a outra. Pelos resultados dos ensaios *in vitro*, existe comunicação na rizosfera entre NGR-NGR e NGR-planta hospedeira, que pode ser mediado através de ER, NW e a própria presença de nemátodes e hospedeiro. Ainda, constatamos o potencial risco que populações virulentas podem representar influenciando outras populações não-virulentas. Contudo, foi possível perceber que o contexto ecológico em as interações entre nemátodes- nemátodes e nemátodes-planta estão inseridas, é determinante para o resultado final destas relações e conseqüentemente para o sucesso do parasitismo dos NGR.

**Palavras-chave:** ascarosídeos, competição, comunicação, exsudatos radiculares, quimiotaxia, virulência

## **Dynamics and virulence acquisition of root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne* in resistant tomato rootstocks**

### **Abstract**

Root-knot nematodes (RKN) (*Meloidogyne* spp.) are obligate plant parasites that cause severe damage worldwide mostly in horticultural crops. Vegetable grafting onto resistant cultivars has gained research interest as a sustainable management strategy for these nematodes. Commercially available rootstocks for tomato, a universal host of RKN, are only partially and differentially resistant to different nematode species, whereby they can change their populational dynamics and potentiate development of virulent populations. However, interspecific interaction processes, their putative mediation by communication compounds produced by nematodes (ascarosides) or emitted in root exudates (RE), and their interaction effects with host plants are largely unknown. The direct and indirect interactions between populations of the four most common RKN species in the rhizosphere of tomato were evaluated through pot and *in vitro* controlled conditions assays. Effects of RE of different origins (susceptible tomato rootstocks) and *nemawater* (NW, water conditioned by compound release by second-stage juveniles), on the behavior, attraction and root infection by RKN were assessed. In pot assays, effects of indirect competition by exploitation, and direct competition by interference were detected. Unexpectedly, facilitation effects of one species over another were also detected. Results of *in vitro* assays, suggest communication between RKN-RKN and RKN-host plant, which can be mediated by RE, NW, and the presence of nematodes and host itself. Further, a potential risk that virulent populations can represent influencing non-virulent populations was noted. It was also possible to elucidate that the ecological context in which nematode-nematode and nematode-plant interactions take place, is determinant for the final result of these relations and hence the success of NGR parasitism.

**Key-words:** ascarosides, chemotaxis, communication, competition, root exudates, virulence

# Índice

Resumo .....	v
Abstract .....	vi
Lista de figuras .....	ix
<b>I - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.    Nemátodes-das-galhas-radiculares, <i>Meloidogyne</i> spp. ....	1
2.    Ciclo de vida de NGR.....	1
3.    Práticas de gestão de NGR .....	3
3.1.    Rotação de culturas .....	3
3.2.    Consociação de culturas .....	4
3.3.    Enxertia .....	5
3.4.    Défice de novas práticas de controlo.....	6
4.    Biodiversidade e controlo horizontal.....	7
5.    Competição entre NGR.....	8
5.1.    Competição por concorrência .....	9
5.2.    Competição por interferência .....	9
5.3.    Competição química .....	10
6.    Ascarosídeos .....	10
7.    Objetivos .....	12
<b>II.    MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
1.    Manutenção e propagação de nemátodes-das-galhas-radiculares, <i>Meloidogyne</i> spp. 13	
2.    Efeitos de competição ( <i>Split-pot</i> ).....	13
3.    Efeito de quimiotaxia de exsudatos radiculares e <i>nemawater</i> .....	15
3.1.    Produção e extração de exsudatos radiculares .....	15
3.2.    Produção e extração de <i>nemawater</i> .....	16
3.3.    Efeito de exsudatos radiculares e <i>nemawater</i> na atração ou repulsão de J2 .....	18
3.4.    Efeito de exsudatos radiculares e <i>nemawater</i> na atração de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> para a raiz.....	20
4.    Análise estatística .....	23
<b>III.    RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
1.    Competição entre NGR.....	25
1.1.    Competição intra e interespecífica direta ou indireta entre NGR .....	25
1.2.    Efeito das espécies de NGR na interação intra e interespecíficas .....	28
2.    Quimiotaxia de NGR .....	34
2.1.    Efeitos de ER e NW na quimiotaxia de NGR (não virulentos) .....	34

2.2.	Efeitos de ER e NW na quimiotaxia de NGR (selecionados virulentos) .....	38
2.3.	Efeito de ER e NW na atração e infecção da raiz por NGR.....	40
IV.	DISCUSSÃO.....	46
1.	Competição direta e indireta entre NGR .....	46
2.	Efeito de componentes químicos na interação NGR-NGR e plantas .....	50
2.1.	Efeitos dos exsudatos radiculares.....	50
2.2	Efeito da <i>nemawater</i> (ascarosídeos) na atração e infecção de NGR.....	52
2.3	Efeitos diretos nas interações entre NGR.....	53
3.	CONCLUSÕES.....	55
V.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57

## Lista de figuras

- Figura 1.** Esquema do ciclo de vida de nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR) *Meloidogyne* spp. (Abrantes *et al.*, 2007). ..... 2
- Figura 2.** Esquema experimental do processo de inóculo de cada tipo de competição: indireta, direta e intraespecífica. (Adaptado de Martinez-Medina *et al.*, 2017). ..... 15
- Figura 3.** Esquema experimental do processo de obtenção de exsudatos radiculares (ER). A – germinação de sementes; B – remoção do excesso de solo das raízes; C – plantas com sistema radicular submerso em água, ao abrigo da luz; D – filtragem de ER (0,22  $\mu\text{m}$ ); E – alíquotas de ER (Adaptado de Duarte *et al.*, 2015). ..... 16
- Figura 4.** Esquema experimental do processo de obtenção de *nemawater* (NW). A – Centrifugação jovens do segundo estágio (J2); B – Incubação sob agitação constante; C – Centrifugação para recolha das suspensões; D – filtragem das suspensões de NW (0,22  $\mu\text{m}$ ); E – Os círculos a cores dentro dos tubos, representam J2 na suspensão homogeneizada (A e C). As setas indicam a sequência dos processos. A base do tubo destacada em rosa, representa os J2 concentrados (A e C). ..... 18
- Figura 5.** Esquema do desenho experimental para teste do efeito de *Nemawater* e exsudatos radiculares na Quimiotaxia de nemátodes-das-galhas-radiculares. \* Os círculos e setas azuis representam os poços de aplicação e a difusão dos tratamentos, respetivamente. O círculo verde, indica o local de inóculo dos nemátodes, enquanto os retângulos verdes representam a dispersão dos nemátodes (Adaptado Wuyts *et al.*, 2006). ..... 20
- Figura 6.** Esquema experimental dos ensaios de quimiotaxia de nemátodes-das-galhas-radiculares envolvendo plantas. A – plântulas após 6 dias de germinação, pré-tratadas a *nemawater* ou exsudatos radiculares de tomateiro suscetível cultivar Tiny Tim; B – plântulas submersas em gel Pluronic 23%; C – Transferências de jovens do segundo estágio (J2); D – raiz ao abrigo da luz; E – J2 dentro da zona de atração + ponta da raiz; F – Incubação (4 dias); G – Nemátodes corados com Fucsina Ácida, com J2 em destaque (Adaptado de Byrd *et al.*, 1983 e Mendy *et al.*, 2017). ..... 22
- Figura 7.** Peso fresco da raiz (g) em plantas de tomateiro suscetível cv. Tiny Tim após 60 dias de exposição a nemátodes em potencial competição interespecífica indireta (verde), interespecífica direta (laranja) e intraespecífica (cinza). Os tratamentos

referem-se à espécie de nemátodes inoculada: A – *Meloidogyne arenaria*, H – *M. hapla*, I – *M. incognita* e J – *M. javanica*. Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o LSD ( $p < 0,05$ ). ..... 26

**Figura 8.** Número total de galhas em raízes de tomateiro suscetível cv. Tiny Tim após 60 dias de exposição a nemátodes em potencial competição interespecífica indireta (verde), interespecífica direta (laranja) e intraespecífica (cinza). Os tratamentos referem-se à espécie de nemátodes inoculada: A – *Meloidogyne arenaria*, H – *M. hapla*, I – *M. incognita* e J – *M. javanica*. Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o LSD ( $p > 0,05$ ). ..... 27

**Figura 9.** Fecundidade em plantas de tomateiro suscetível cv. Tiny Tim após 60 dias de exposição a nemátodes em potencial competição interespecífica indireta (verde), interespecífica direta (laranja) e intraespecífica (cinza). Os tratamentos referem-se à espécie de nemátodes inoculada: A – *Meloidogyne arenaria*, H – *M. hapla*, I – *M. incognita* e J – *M. javanica*. Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o LSD ( $p < 0,05$ ). ..... 28

**Figura 10.** Peso da raiz em plantas de tomateiro suscetível cv. Tiny Tim após 60 dias de exposição aos tratamentos: interação interespecífica indireta e interação intraespecífica. Os tratamentos referem-se as espécies competidoras sendo: A – *Meloidogyne arenaria* (laranja), H – *M. hapla* (verde), I – *M. incognita* (amarelo), J – *M. javanica* (azul). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o LSD ( $p > 0,05$ )..... 29

**Figura 11.** Número de galhas em plantas de tomateiro suscetível cv. Tiny Tim após 60 dias de exposição aos tratamentos: interação interespecífica indireta e interação intraespecífica. Os tratamentos referem-se as espécies competidoras sendo: A – *Meloidogyne arenaria* (laranja), H – *M. hapla* (verde), I – *M. incognita* (amarelo), J – *M. javanica* (azul). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o LSD ( $p > 0,05$ ). ..... 30

**Figura 12.** Número de massas de ovos em plantas de tomateiro suscetível cv. Tiny Tim após 60 dias de exposição aos tratamentos: interação interespecífica indireta e interação intraespecífica. Os tratamentos referem-se as espécies competidoras sendo: A – *Meloidogyne arenaria* (laranja), H – *M. hapla* (verde), I – *M. incognita* (amarelo), J – *M. javanica* (azul). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o LSD ( $p>0,05$ ). ..... 31

**Figura 13.** Fator de reprodução em plantas de tomateiro suscetível cv. Tiny Tim após 60 dias de exposição aos tratamentos: interação interespecífica indireta e interação intraespecífica. Os tratamentos referem-se as espécies competidoras sendo: A – *Meloidogyne arenaria* (laranja), H – *M. hapla* (verde), I – *M. incognita* (amarelo), J – *M. javanica* (azul). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o LSD ( $p>0,05$ )..... 32

**Figura 14.** A fecundidade em plantas de tomateiro suscetível cv. Tiny Tim após 60 dias de exposição aos tratamentos: interação interespecífica indireta e interação intraespecífica. Os tratamentos referem-se as espécies competidoras sendo: A – *Meloidogyne arenaria* (laranja), H – *M. hapla* (verde), I – *M. incognita* (amarelo), J – *M. javanica* (azul). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o LSD ( $p>0,05$ )..... 33

**Figura 15.** Efeito das exsudatos radiculares de diferentes cultivares de tomateiro (Armstrong, Embajador, Emperador, Silex e Tiny Tim) na atração de isolados das 4 espécies mais comuns de nemátodes-das-galhas-radiculares, *Meloidogyne* spp. Nemátodes utilizados: *M. hapla*; *M. arenaria*; *M. javanica* e *M. incognita* (variável x1). Componentes químicos (variável x2): Exsudatos radiculares de porta-enxertos parcialmente resistentes cv. Armstrong (“ER ARM”), cv. Embajador (“ER EMB”), cv. Emperador (“ER EMP”), cv. Silex (“ER SIL”) e cv. de tomateiro susceptível Tiny Tim (“ER TT”). Testemunhas neutra, positiva (atrativa) e negativa (repelente): água destilada (“N”), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,5M (“A”) e ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 1% (“R”). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p>0,05$ ). ..... 35

**Figura 16.** Efeito da *Nemawater* de nemátodes-das-galhas-radiculares, *Meloidogyne* spp. na atração interespecífica: *M. javanica* - H, *M. arenaria* - A, *M. javanica* - J, *M. incognita* - J (*variável*  $x_1$ ). Tratamentos (*variável*  $x_2$ ): “NW” indica *Nemawater*, “A” - cloreto de cálcio 0,5 M (atrativo), “R” - ácido acético 1% (repelente), “N” - água destilada (controlo). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )..... 37

**Figura 17.** Efeito de exsudatos radiculares de diferentes cultivares de tomateiro (Armstrong, Embajador, Emperador, Silex e Tiny Tim) na atração de isolados de *Meloidogyne javanica*: “Mai” - isolado de *M. javanica*, “vMai ARM” e “vMai SIL” - selecionados virulentos de *M. javanica* em porta-enxertos parcialmente resistentes cv. Armstrong e cv. Silex, respectivamente (*variável*  $x_1$ ). Componentes químicos (*variável*  $x_2$ ): exsudatos radiculares de porta-enxertos parcialmente resistentes cv. Armstrong (“ER ARM”), cv. Embajador (“ER EMB”), cv. Emperador (“ER EMP”), cv. Silex (“ER SIL”) e cv. de tomateiro susceptível Tiny Tim (“ER TT”). Testemunhas neutra, positiva (atractiva) e negativa (repelente): água destilada (“N”), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,5M (“A”) e ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  1%) (“R”). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )..... 38

**Figura 18.** Efeito da *Nemawater* de isolados de *Meloidogyne javanica* (original e virulentos) na atração intraespecífica: “Mai” - isolado de *M. javanica*, “vMai ARM e vMai SIL” - selecionados virulentos de *M. javanica* em porta-enxertos parcialmente resistentes cv. Armstrong e cv. Silex, respectivamente (*variável*  $x_1$ ). Tratamentos (*variável*  $x_2$ ): “NW” indica *Nemawater*, “A” - cloreto de cálcio 0,5 M (atrativo), “R” - ácido acético 1% (repelente), “N” - água destilada (controlo). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )..... 39

**Figura 19.** Percentagem de jovens no segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* na zona de atração em cultivares de tomateiro susceptível cultivar Tiny Tim (TT) e porta-enxertos Armstrong e Silex, após 4h de incubação aos tratamentos: exsudatos radiculares (ER) de TT e água. Os resultados representam a média estimada +/- erro

padrão de 3 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p>0,05$ ). ..... 40

**Figura 20.** Percentagem de jovens no segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* na zona de atração em cultivares de tomateiro suscetível da cultivar Tiny Tim (TT) e porta- enxertos Armstrong e Silex, após 4 dias de incubação aos tratamentos: exsudatos radiculares (ER) de TT e água. Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 3 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p>0,05$ ). ..... 41

**Figura 21.** Percentagem de jovens de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* na zona de atração em cultivares de tomateiro susceptível cultivar Tiny Tim (TT) e porta- enxertos Armstrong (ARM) e Silex (SIL), após 4h de incubação aos tratamentos: cultivar + *Nemawater* de nemátodes selecionados e virulentos (“v”) correspondentes. Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p>0,05$ ). ..... 42

**Figura 22.** Percentagem de jovens de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* dentro da raiz em cultivares de tomateiro porta-enxertos Armstrong (ARM), Silex (SIL) e susceptível cultivar Tiny Tim (TT), após 4 dias de incubação aos tratamentos: cultivar + *Nemawater* de nemátodes selecionados e virulentos (“v”) correspondentes. Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p>0,05$ ). ..... 43

**Figura 23.** Efeito da cultivar e tipo de competição em isolados de *Meloidogyne javanica* na atração intraespecífica e interespecífica. Tratamentos (*variável*  $x_1$ ): “ARM” indica cultivar Armstrong, “SIL” – cultivar Silex, “TT” – cultivar Tiny Tim. Tratamentos (nemátodes utilizados): “Mai” – isolado de *M. javanica*, “vMai ARM” e “vMai SIL” – selecionados virulentos de *M. javanica* em porta-enxertos parcialmente resistentes cv. Armstrong e cv. Silex, respectivamente (*variável*  $x_2$ ). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p>0,05$ ). ..... 44

**Figura 24.** Efeito da cultivar e tipo de competição em isolados de *Meloidogyne javanica* na infeção intraespecífica e interespecífica. Tratamentos (*variável*  $x_1$ ): “ARM” indica cultivar Armstrong, “SIL” – cultivar Silex, “TT” – cultivar Tiny Tim. Tratamentos (nemátodes utilizados): “Mai” – isolado de *M. javanica*, “vMai ARM” e “vMai SIL” –

selecionados virulentos de *M. javanica* em porta-enxertos parcialmente resistentes cv. Armstrong e cv. Silex, respectivamente (*variável*  $x_2$ ). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p>0,05$ )..... 45

## I - INTRODUÇÃO

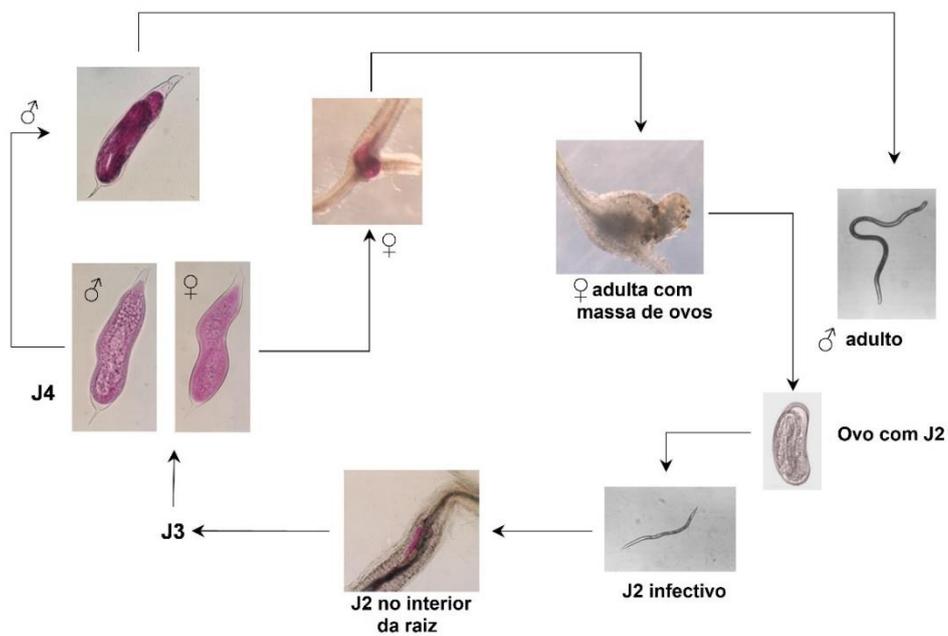
### 1. Nemátodes-das-galhas-radiculares, *Meloidogyne* spp.

Os nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR), do género *Meloidogyne*, são fitoparasitas de grande influência para a agricultura mundial em diversos tipos de culturas (Jones *et al.*, 2013). Espécies deste género apresentam a capacidade de infectar todas as plantas vasculares, sendo o grupo de maior impacto negativo para a economia, representando uma das principais causas da quebra de produção em algumas culturas (Nicol *et al.*, 2011). Além disso, os NGR são os nemátodes fitoparasitas com maior distribuição espacial, com destaque a algumas espécies mundialmente mais comuns, nomeadamente *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita*, e *M. javanica* (Jones *et al.*, 2013). Uma vez dentro do hospedeiro, esses animais estabelecem locais de alimentação que induzem a formação de estruturas globosas na raiz, denominadas galhas (Byrd e Opperman, 1998; Trudgill e Blok, 2001). Além de diminuir a absorção de água e nutrientes por parte da planta, esses parasitas acabam ainda por reduzir a capacidade das plantas em resistir contra outros agentes patogénicos (Nicol *et al.*, 2011). A redução da resistência, está diretamente relacionada com a limitação de recursos da planta, visto que, as galhas induzidas pelos NGR acabam por interferir indiretamente nos sistemas de defesa da planta (David Mck Byrd *et al.*, 2014). Assim, os NGR são um dos principais desafios para agricultura atual, sendo os responsáveis por grande parte da quebra de produção e qualidade de diversos produtos agrícolas.

### 2. Ciclo de vida de NGR

A capacidade dos NGR em ocasionar impactos negativos em sistemas agrícolas está associada ao ciclo de vida desses organismos (Fig. 1), e da sua relação íntima com os seus hospedeiros (Sorribas *et al.*, 2005; S Verdejo-Lucas *et al.*, 2009). A interação parasita-hospedeiro está associada à necessidade desses nemátodes por locais de alimentação e reprodução para completarem o seu ciclo de vida, uma vez que são endoparasitas obrigatórios (D. Mck. Byrd & Opperman, 1998; Nicol *et al.*, 2011; Trudgill & Blok, 2001). Ao longo do ciclo de vida dos NGR, os nemátodes passam por quatro mudas e vão sofrendo alterações morfológicas e fisiológicas. Dentro do ovo, a embriogénese origina o primeiro estágio juvenil (J1), que ainda dentro do ovo sofre uma muda transitando para o segundo estágio (J2). O J2 é o estágio infetivo que eclode e

apresenta mobilidade e capacidade de procurar por uma planta hospedeira (Byrd e Opperman, 1998). A busca por recursos nestes organismos, está associada à atração por fitoquímicos emitidos pelos seus hospedeiros, também designada quimiotaxia (Brinkman *et al.*, 2008). A humidade do solo tem um papel fundamental na atividade destes parasitas, visto que, em níveis muito baixos de humidade estes podem sofrer por dessecação ou não ter água o suficiente para manter seus processos fisiológicos (Poulin & Randhawa, 2013). No entanto, os J2 apresentam uma grande resistência a condições adversas, sendo considerados um estágio funcionalmente semelhante ao *dauer* (D. Mck. Byrd & Opperman, 1998). Após a invasão da planta hospedeira, o J2 migra até se fixar dentro do sistema radicular e começa a formar locais de alimentação, libertando compostos que induzem a formação de galhas na raiz. Nesse ponto, sob estas condições o J2 continua a se alimentar, sofrendo mudas até o estágio adulto (Serenio & Danchin, 2014; Triantaphyllou, 1973).



**Figura 1.** Esquema do ciclo de vida de nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR) *Meloidogyne* spp. (Abrantes *et al.*, 2007).

Vários parâmetros do ciclo de vida dependem de fatores como a densidade populacional dos nemátodes e da situação em que a planta hospedeira se encontra, seguindo os aspetos de disponibilidade de recursos. O recurso disponibilizado pela planta é o principal fator que determina o sexo da fase adulta dos nemátodes, com uma maior diferenciação de machos em caso de escassez de alimento. Essa diferenciação de machos e fêmeas está relacionada ao alto gasto energético na reprodução, presente somente nas fêmeas; apenas as fêmeas permanecem e se alimentam no interior da raiz; os machos não se alimentam e abandonam a raiz (Sereno & Danchin, 2014; Triantaphyllou, 1973). Apesar deste conhecimento, a diferença biológica entre os dois sexos nos nemátodes ainda não é uma alternativa de gestão de NGR, uma vez que os métodos atuais de produção favorecem o desenvolvimento desses nemátodes, não restringindo de modo relevante a diferenciação de fêmeas. No entanto outros métodos de proteção das culturas contra o ataque de NGR têm sido investigados e aplicados como alternativas de gestão destes agentes fitopatogênicos (Nicol *et al.*, 2011).

### **3. Práticas de gestão de NGR**

Devido aos danos económicos que os NGR causam nas culturas, tem havido um grande investimento para o desenvolvimento de alternativas de controlo e prevenção contra infestações de nemátodes (Putten *et al.*, 2006). A utilização de nematodocidas sintéticos é o método mais eficiente de controlo, no entanto o seu efeito é apenas temporário nas populações de NGR. O uso frequente do mesmo pesticida acaba por perder eficácia ao longo do tempo, visto que, demandam frequente aplicação e podem atuar como força seletiva de indivíduos mais resistentes (Arena *et al.*, 2018). Além do efeito temporal, os nematodocidas não apresentam especificidade de alvo, e exprimem elevada toxicidade para diversos organismos, consoante a sua concentração e tempo de exposição (Nicol *et al.*, 2011; Putten *et al.*, 2006). Com base nesses impactos negativos para a biota e o meio ambiente, muitos países restringem o uso de muitos pesticidas ou aumentam o controlo sobre a sua utilização (Arena *et al.*, 2018).

#### **3.1. Rotação de culturas**

Uma prática alternativa ao uso dos pesticidas é a rotação de culturas agrícolas, como o próprio nome diz, corresponde a troca periódica das espécies cultivadas, de forma a favorecer alguns processos naturais, incluindo aspectos edáficos e biológicos

(Talavera *et al.*, 2009). Esta prática tem sido utilizada como método de controlo para algumas doenças e pragas, incluindo os NGR (Sorribas *et al.*, 2005; Talavera *et al.*, 2009). A rotação com plantas não-hospedeiras tem sido um dos métodos mais eficazes na redução da densidade populacional destes organismos (Sorribas *et al.*, 2005). A contrapor estas vantagens, a rotação de culturas utilizando cultivares resistentes pode contribuir para a adaptação e seleção natural de indivíduos ao longo do tempo, de forma a aumentar a virulência em algumas populações de NGR (Nicol *et al.*, 2011). O aumento da virulência está associado à melhoria da capacidade de infectividade e reprodução dos nemátodes ao longo das gerações. Ou seja, o uso inadequado desta prática, pode seleccionar indivíduos mais virulentos, agressivos, tornando as populações subsequentes ainda mais difícil de controlar (Soledad Verdejo-Lucas *et al.*, 2013). Outro desafio acerca desta prática está associado a ampla gama de hospedeiros que os nemátodes podem infetar, tornando o uso desta prática muitas vezes limitado, uma vez que é preciso ponderar os custos (financeiro) e benefícios (controlo) envolvidos no uso da rotação de culturas (Sorribas *et al.*, 2005; Thies *et al.*, 2004).

### **3.2. Consociação de culturas**

Mais uma prática comumente utilizada para o controlo de NGR é a consociação de culturas, que se baseia no cultivo associado com duas ou mais espécies (Zavaleta & Gomez, 1995). O sucesso desta prática, depende principalmente dos aspectos edáficos e identidade das espécies envolvidas (Altieri & Liebman, 1986). Quando definido o *pool* de espécies “ideais”, idade e estágios fenológicos das plantas, esta prática pode representar a solução de diversos problemas associados a pragas e doenças, incluindo os NGR (Malézieux *et al.*, 2009). Além disso, o cultivo em consociação aumenta a biodiversidade local, uma vez que proporciona diferentes micro habitats e diversidade de nichos alimentares, evitando a explosão populacional de parasitas específicos e suportando mais espécies em equilíbrio (Malézieux *et al.*, 2009; Ratnadass *et al.*, 2012). Por outro lado, definir o *pool* de espécies é um desafio, visto que as plantas podem competir entre si por condições e recursos, podendo ser um fator limitante para a produção-alvo (Ratnadass *et al.*, 2012). Ainda assim, outra desvantagem deste método pode estar relacionada com a escala de produção, não sendo muitas vezes exequível em agricultura convencional, ou requerendo mais espaço, logística e conhecimento.

### 3.3. Enxertia

A enxertia, uma prática mais recente de gestão dos nemátodes, consiste na união entre partes do tecido vegetal de duas plantas diferentes, tipicamente uma contribuindo a raiz e outra o caule, com o fim de produzir uma única planta funcional, com melhor desenvolvimento ou defesa contra agentes patogénicos (ex. NGR, vírus) (Rivard & Louws, 2008; Venema *et al.*, 2008). O processo de enxertia ocorre a partir do corte e junção dos tecidos vegetais das plantas, de forma a proporcionar o desenvolvimento e crescimento de um único organismo. O sucesso no processo da enxertia pode depender da compatibilidade e afinidade entre as duas espécies, nomeadamente o porta-enxerto e enxerto. Porta-enxertos de tomateiro, por exemplo, resultam da hibridização de tomateiro domesticado *Solanum lycopersicum* com tomateiros selvagens (ex. *S. habrochaites*) (Williamson, 1998). Tal união confere maior resistência/ tolerância natural a NGR e outras doenças do solo, o que reduz a necessidade de aplicação de pesticidas, além de manter ou melhorar a produção (Rivard e Louws, 2008; Rumbos *et al.*, 2011). A resistência, tolerância e susceptibilidade à infeção e reprodução dos nemátodes, está associada a diferentes respostas das plantas ao ataque dos nemátodes. A resistência nos porta-enxertos é atribuída à planta que não permite a reprodução dos nemátodes, também classificada como resistente. Para o caso da planta que reduz os danos ocasionados pela infeção dos nemátodes, e reduzem a reprodução, são classificadas como tolerantes. A susceptibilidade é atribuída a plantas que não conferem nenhuma resistência a infeção dos nemátodes, uma vez que conseguem infetar e se reproduzir livremente (Wesemael & Moens, 2011).

O principal mecanismo responsável por essa maior resistência contra NGR em porta-enxertos de tomateiro pode ser o gene *Mi*. O gene *Mi* é um dos principais genes codificantes de proteínas associadas aos mecanismos de defesa das plantas sob ataque de nemátodes (Ho *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 2001). Este gene, presente em diversas plantas, apresenta variabilidade em termos de estrutura molecular, e confere diferentes resistências aos diferentes agentes patogénicos das plantas, especialmente aos NGR (Milligan *et al.*, 1998). Alguns estudos, relataram a importância do gene *Mi* para o controlo de nemátodes do género *Meloidogyne* com grandes impactos económicos, principalmente: *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica* (Seid *et al.*, 2015; Verdejo- Lucas *et al.*, 2013; Viljoen *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2001). Apesar do gene *Mi*

conferir resistência contra algumas espécies de NGR de importância económica, não tem influência direta demonstrada contra *M. hapla*, espécie de ampla distribuição em climas temperados (Brown *et al.*, 1997; Molinari & Miacola, 1997). Outro desafio acerca do gene *Mi* é a perda de funcionalidade a temperaturas superiores a 28°C (Williamson, 1998). Ou seja, tal quebra funcional do gene *Mi* pode refletir-se numa maior susceptibilidade de infeção por parte das plantas e ainda dificultar a gestão em campo, considerando a variação e limitação de controlo da temperatura (Verdejo-Lucas *et al.*, 2013; Williamson, 1998). Ainda assim, com base nos benefícios associados ao gene *Mi*, porta-enxertos de tomateiros resistentes contendo esse gene passaram a ser comercializados e utilizados como alternativas economicamente mais viáveis de prevenção e controlo de nemátodes (Sorribas *et al.*, 2005). Embora os benefícios sejam notáveis, é preciso reconhecer que os porta-enxertos por si só, não garantem resistência total contra NGR, e não há ainda no mercado porta-enxertos totalmente resistentes (Verdejo-Lucas *et al.*, 2012). A resistência parcial conferida por estes porta-enxertos poderá ela própria servir como pressão de seleção sobre as populações de nemátodes, atuando no sentido de alterar a dominância de diferentes espécies de *Meloidogyne* co-ocorrendo no campo, ou proporcionando vantagem competitiva a nemátodes mais virulentos, pelos mecanismos propostos acima. A virulência é um conceito que envolve a interação nemátode-hospedeiro, e que depende de ambos os organismos; assim, o grau de virulência de um nemátode está relacionado com a planta infetada (S Verdejo-Lucas *et al.*, 2009; Wesemael & Moens, 2011). Isto é, o facto de alguns poucos indivíduos terem sucesso em parasitar as plantas resistentes, atua como vantagem competitiva desses indivíduos, aumentando a abundância dos mais aptos, que por sua vez, podem parasitar um maior número de plantas, dificultando ainda mais o processo de controlo desses organismos. Assim, de forma geral, a virulência de uma dada população pode aumentar em poucos ciclos de vida, ampliando a capacidade desses organismos em ocasionar impactos negativos em sistemas agrícolas (Sorribas *et al.*, 2005; Verdejo-Lucas *et al.*, 2009; Verdejo-Lucas *et al.*, 2012).

### **3.4 Déficit de novas práticas de controlo**

De forma geral, todas as práticas de gestão dos NGR apresentam vantagens e desvantagens, com eficácia e sustentabilidade dependente do contexto ecológico e sua utilização (Milligan *et al.*, 1998; Nicol *et al.*, 2011). Ainda assim, algumas práticas

apresentam a facilidade de uso combinado com outras práticas, como por exemplo, a utilização de plantas enxertadas em um sistema de rotação ou consociação de culturas, de forma a mitigar ou ultrapassar algumas limitações (Landi *et al.*, 2018). Apesar destas possibilidades terem os seus valores para as práticas agrícolas atualmente, a gestão dos NGR carece de novos métodos e práticas de controlo mais eficazes e sustentáveis (Manosalva *et al.*, 2015). Face às alterações climáticas previstas e aceleradas, e ao aumento da demanda de produtos agrícolas, uma inovação prática de controlo dos NGR pode representar significativas mudanças económicas e ambientais (Ratnadass *et al.*, 2012). Atingir ou superar um limiar de produção de forma mais sustentável, e que não impliquem na perda de biodiversidade é um dos principais objetivos e desafios para a ciência atual (Viljoen *et al.*, 2019).

#### **4. Biodiversidade e controlo horizontal**

A biodiversidade é um dos principais componentes responsáveis pelo equilíbrio e serviços dos ecossistemas (Tilman & Downing, 1994). Apesar de sabido o papel essencial da biodiversidade, ainda não houve mudanças significativas quando pensamos nos modelos atuais de produção agrícola, que por vezes são de carácter destrutivo e insustentável dos serviços e recursos dos sistemas naturais (Sorribas *et al.*, 2005). A necessidade de controlo das pragas e doenças agrícolas nesses modelos muitas vezes não são específicas e acabam por afetar diretamente muitos outros organismos associados às culturas (Nicol *et al.*, 2011). Os NGR são um exemplo de organismos alvo de controlo nesses sistemas, em que a sua gestão acaba por ter impacto também sobre outros organismos, incluindo outras espécies de nemátodes de vida livre (Putten *et al.*, 2006). Tal facto, é um grande problema, visto que a comunidade de nemátodes do solo apresenta um papel fundamental na decomposição de matéria orgânica e remineralização de nutrientes, entre outras funções importantes (Cortet *et al.*, 1999; Sochová *et al.*, 2007). Por consequência, os modelos de cultivo convencionais acabam por favorecer o desequilíbrio do sistema, podendo aumentar o número e severidade de ataque de pragas e doenças agrícolas e criar a necessidade de intervenção por algum método de controlo (Jones *et al.*, 2013). Em contrapartida, o uso de solo para fins agrícolas é inevitável, dado que, seu uso é a base para o fornecimento de alimento humano (Viljoen *et al.*, 2019). Ainda assim, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos para diminuir o impacto da produção agrícola nos recursos naturais e biodiversidade.

No que diz respeito ao controlo de NGR, ainda não existe um método específico, devidamente eficaz e igualmente sustentável (Blaxter e Koutsovoulos, 2015). Apesar disso, a busca por mecanismos naturais de respostas dos NGR, especialmente os que envolvem as interações intra e inter-específicas seguindo aspectos de competição, apresentam grande potencial para práticas de controlo futuras (Brinkman *et al.*, 2008). A competição entre nemátodes resultará teoricamente numa forma de controlo horizontal (dentro do mesmo nível trófico), representando uma possível forma de gestão de NGR. No entanto, as interações entre nemátodes fitoparasitas, e particularmente, entre espécies de NGR, têm sido muito pouco exploradas pela investigação. São então ainda largamente desconhecidos os mecanismos subjacentes e os potenciais resultados da interação entre espécies de NGR.

## **5. Competição entre NGR**

A relação de competição nemátode-nemátode envolvendo nemátodes fitoparasitas pode ser observada, tanto com indivíduos da mesma espécie, como entre indivíduos de espécies distintas (Melakeberhan & Dey, 2003). É possível retratar as interações de competição entre nemátodes fitoparasitas, de acordo com os mecanismos envolvidos em cada uma das situações, sobretudo, competição por concorrência, interferência e química (Duncan & Ferris, 1983; Schoener, 1983). A competição por consumo ou concorrência, ocorre quando um recurso é consumido por um indivíduo, tornando este recurso indisponível para outros (ex. água, nutrientes, alimento) (Umesh *et al.*, 1994). Outro mecanismo mediador da competição entre os nemátodes é a supressão ou interferência (competição direta), incluindo o uso do espaço. Por último e igualmente importante, a competição química está associada as interações que envolvem compostos químicos de comunicação ou sinalização (Kaplan *et al.*, 2012). Os mecanismos deste tipo de competição podem ser observados com a emissão de compostos nocivos ou de marcação territorial (ex. aleloquímicos e feromonas), que de alguma forma prejudicam outros organismos envolvidos (Schoener, 1983). Embora estes conceitos estejam bem definidos e aplicados para muitos organismos, ainda existe um grande défice de conhecimento quando pensamos nos NGR, especialmente interação NGR-NGR (Melakeberhan & Dey, 2003). Entender que mecanismos estão por trás das interações estabelecidas entre NGR e entre eles e outros organismos, incluindo

os seus hospedeiros, poderá facilitar o desenvolvimento de novas práticas para o controlo dos nemátodes (Keating *et al.*, 2010).

### **5.1 Competição por concorrência**

Apesar de haver poucos estudos de competição envolvendo os NGR, é possível auferir de conhecimentos sobre outros que envolvem outros nemátodes e NGR. Por exemplo, estudo de competição por concorrência, envolvendo duas espécies de nemátodes, nomeadamente *Pratylenchus neglectus* e *M. chitwoodi* em cultivo de batata (hospedeiro). A combinação entre as duas espécies no mesmo hospedeiro, implicou a redução do índice de reprodução de *M. chitwoodi* que foi atribuído ao aumento da densidade populacional dos nemátodes no interior da raiz (Umesh *et al.*, 1994). Ou seja, existe um limiar da densidade de nemátodes que a planta é capaz de suportar como hospedeira (designada *carrying capacity* ou a capacidade de carga), e em situações de alta infestação, *P. neglectus* demonstra explorar o recurso disponível de forma mais rápida e eficiente, quando comparada a *M. chitwoodi*. Tal relação de competição entre as estas espécies foi classificada como competição por concorrência. Outros estudos também encontraram resultados semelhantes, utilizando distintos hospedeiros e espécies de nemátodes, incluindo espécies do género *Meloidogyne*. Os autores sugeriram que o resultado da competição entre os nematódos pode ser consequência da ordem de infeção de cada uma das espécies envolvidas. Isto é, a infeção antecipada de uma determinada espécie pode favorecer o seu desempenho como competidora, e/ou interferir no processo de infeção da espécie subsequente (Chitambar & Raski, 1984; Melakeberhan & Dey, 2003).

### **5.2 Competição por interferência**

A aplicabilidade do conceito de competição por interferência entre nemátodes fitoparasitas e seus hospedeiros, está associada à supressão de locais de alimentação e/ou reprodução por outras espécies em coabitação (Gay e Byrd, 1973). A presença combinada de determinadas espécies, pode exercer influência sobre as outras espécies, mesmo de géneros distintos (Duncan & Ferris, 1983; Estores & Chen, 1972). Em situação manipulativa de laboratório utilizando o tomateiro (*S. lycopersicum*) como hospedeiro, foi observada a influência negativa da presença de *M. incognita* na reprodução e locais de alimentação de *P. brachyurus* (Estores & Chen, 1972). Além disso, também observaram a influência de *M. incognita* que modificou e desencadeou a produção de

compostos químicos adversos à infecção por *P. brachyurus*, sugerindo uma interferência indireta mediada pelo hospedeiro (Estores & Chen, 1972). Resultados semelhantes foram verificados utilizando o tomateiro como hospedeiro (Gay e Byrd, 1973; Manosalva *et al.*, 2015). Outros padrões foram encontrados, ao observar as interações entre as mesmas espécies de nemátodes, mas inoculados em outros hospedeiros. Em raízes de algodão por exemplo, a presença de *M. arenaria* ou *M. incognita*, demonstrou facilitar o processo de infecção e desenvolvimento de *P. brachyurus*, enquanto não teve influência em raízes de tabaco e alfafa (Gay e Byrd, 1973). Estudos mais recentes, verificaram que a temperatura e identidade da planta hospedeira, têm um papel-chave, sendo capazes de modular os resultados das interações entre os nemátodes (Brinkman *et al.*, 2008; Umesh *et al.*, 1994). Por outro lado, ainda não foram revelados os mecanismos por trás dessas mudanças, nem como elas podem alterar os processos físicos e químicos, envolvidos na competição entre os nemátodes.

### **5.3 Competição química**

A competição mediada por compostos químicos pode, muitas vezes, desencadear diferentes comportamentos consoante a identidade das espécies envolvidas, podendo estes ser classificados como feromonas ou aleloquímicos (Kaplan *et al.*, 2012; Srinivasan *et al.*, 2008). Tal classificação depende das espécies envolvidas, considerando a relação emissor-receptor do sinal químico. Quando a interação envolve dois organismos da mesma espécie, é mediada por feromonas (Srinivasan *et al.*, 2008). Para as interações que envolvem organismos de espécies distintas, a classificação passa a ser mediada por aleloquímicos (Kaplan *et al.*, 2012). A natureza desses compostos, é dependente da identidade da espécie emissora, além de poder desencadear diferentes respostas aos diferentes receptores. Embora apresentem componentes químicos em comum (ascarosídeos) entre si, os nemátodes também apresentam pluralidade de compostos e interações, considerando a relação emissor-receptor (Lambert *et al.*, 1999; Manosalva *et al.*, 2015). No entanto, as interações químicas acerca das relações entre nemátodes e outros organismos, incluindo outros nemátodes e seus hospedeiros, ainda carece de informações (Manosalva *et al.*, 2015).

## **6. Ascarosídeos**

Os ascarosídeos são compostos químicos pertencentes ao grupo dos glicolípidos, sendo constituídos pelo açúcar ascarilose, exclusivo dos nemátodes, ligado a uma cadeia

lipídica de variável estrutura (Kaplan *et al.*, 2012; Pungaliya *et al.*, 2009). Muitos ascarosídeos já foram identificados, em termos estruturais e funcionais (Byrd *et al.*, 2014; Kaplan *et al.*, 2012), e revelaram ser capazes de modular as interações nemátode- nemátode (Manosalva *et al.*, 2015). Muito do que se sabe sobre os ascarosídeos e como estes compostos podem modificar o comportamento nos nemátodes, está relacionado aos estudos realizados com outras espécies de nemátodes, especialmente *Caenorhabditis elegans* (Srinivasan *et al.*, 2012). Por exemplo, misturas de ascarosídeos associados ao acasalamento provocam atração de machos adultos (Srinivasan *et al.*, 2012). Outras combinações de ascarosídeos, atraíram machos adultos de *C. elegans* para o mesmo local, sugerindo agregação (Macosko *et al.*, 2009), ou induziram comportamento de repulsão, com o afastamento dos nemátodes do ponto de aplicação dos ascarosídeos (Kaplan *et al.*, 2012; Srinivasan *et al.*, 2012). Além da influência dos ascarosídeos para o comportamento dos nemátodes, outros processos associados a fisiologia destes organismos são regulados, como a taxa de fertilidade e diferenciação de machos ou fêmeas, por exemplo (von Reuss *et al.*, 2012). O efeito dos ascarosídeos pode ser modulado pela sua concentração, mas também pelas proporções de diferentes ascarosídeos em misturas produzidas e libertadas pelos nemátodes. A própria produção de diferentes ascarosídeos é influenciada pelas condições ambientais e fisiológicas dos nemátodes (disponibilidade de recursos, estágio de desenvolvimento, etc.) (Choe *et al.*, 2012; von Reuss *et al.*, 2012). Além disso, os nemátodes produzem ascarosídeos constitutivamente, mas nem todos os ascarosídeos produzidos são libertados, sugerindo um vocacionar da comunicação entre nemátodes (Yu *et al.*, 2021).

A estrutura dos ascarosídeos (comprimento da cadeia lipídica, ligações de diferentes moléculas à ascarilose ou à cadeia lipídica) pode ser alterada por enzimas associadas ao metabolismo primário, resultando em diferentes famílias e funções destes compostos de comunicação. Pela ampla disponibilidade de capacidade enzimática e pela sua libertação pelos nemátodes no meio em que se encontram, resultando numa 'difusão pública', uma multitude de outros organismos podem perceber e modificar os ascarosídeos, alterando a comunicação entre nemátodes (Diaz *et al.*, 2014). Assim, o papel dos ascarosídeos nas interações NGR-planta tem vindo a ser recentemente investigado. A planta hospedeira é capaz de identificar os ascarosídeos, ativando seu arsenal de defesa, aumentando a resistência aos nemátodes, podendo interferir na

competição de forma indireta (Lambert *et al.*, 1999; Manosalva *et al.*, 2015). Por outro lado, as plantas podem também captar, transportar e alterar os ascarosídeos, libertando-os em formas diferentes, com a capacidade de repelir, em vez de atrair NGR (Manohar *et al.*, 2020). Até então, não se sabe até que ponto, as interações químicas mediadas pelos ascarosídeos, estão associadas aos outros tipos de competição, especialmente quando pensamos na grande diversidade de nemátodes e consequentemente uma grande pluralidade de compostos químicos (Byrd *et al.*, 2014; Jagdale *et al.*, 2009). Ainda assim, tais compostos apresentam um grande potencial envolvimento acerca da competição entre os nemátodes, mediada ou não pela planta, que podem ser explorados para o desenvolvimento de novos métodos de controlo de NGR.

## **7. Objetivos**

O objetivo principal deste trabalho é o de investigar a ecologia das interações entre NGR, elucidando os mecanismos de competição e de aquisição de virulência que poderão ser explorados no desenvolvimento de novas estratégias de controlo e prevenção destes agentes patogénicos em agroecossistemas. São objetivos específicos i) averiguar e quantificar diferentes tipos de competição (direta ou indireta) entre nemátodes de diferentes espécies do género *Meloidogyne*; ii) investigar de que forma as interações entre nemátodes poderão ser mediadas pela planta hospedeira, incluindo pelos seus exsudatos radiculares; iii) avaliar o potencial papel da comunicação entre nemátodes através de ascarosídeos na modulação da sua interação com as plantas hospedeiras.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

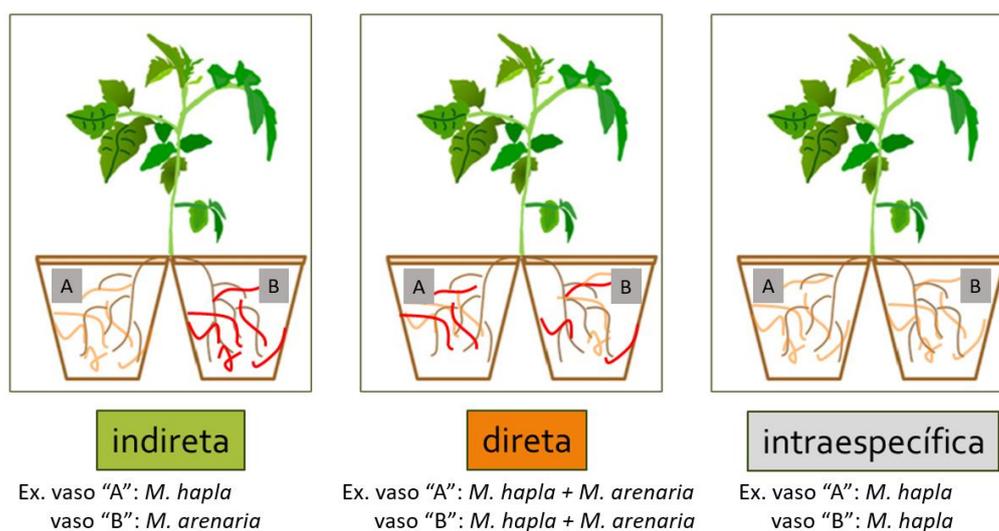
### 1. Manutenção e propagação de nemátodes-das-galhas-radiculares, *Meloidogyne* spp.

Todas as populações utilizadas neste trabalho pertencem à coleção do grupo de Nematologia, do Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA) da Universidade do Minho e estão a ser utilizadas no âmbito do Projeto HANDLER (POCI-01-0145-FEDER-029283; PTDC/ASP-PLA/29283/2017) coordenado pela Doutora Sofia Costa. As populações de NGR pertencem às quatro espécies mais comuns mundialmente: *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita*, e *M. javanica*, foram isoladas de massas de ovos individuais. Para aumentar o número de indivíduos, de forma a possibilitar a realização dos bioensaios de interações nemátode-nemátode, nemátode-planta e produção de *nemawater*, as populações de cada espécie foram propagadas em tomateiro susceptível cv. Tiny Tim em vasos contendo solo comercial (Siro Planta), areia e vermiculite esterilizados (1,5:1:1). As plantas foram inoculadas com 10 massas de ovos e os vasos mantidos numa estufa a 25°C com 16 horas de fotoperíodo e rega diária. Após 60 dias, as plantas foram desvasadas e as suas raízes lavadas, sendo então recolhidas massas de ovos para inocular novos tomateiros. Este procedimento foi repetido a cada 2 meses para manutenção das populações. Também foram mantidas da mesma forma populações de *M. javanica* virulentas, selecionadas em porta-enxertos parcialmente resistentes cv. Silex e cv. Armstrong, e sempre multiplicadas nos porta-enxertos respetivos.

### 2. Efeitos de competição (*Split-pot*)

Para avaliar possíveis efeitos de competição direta (por interferência) e indireta (por concorrência) na interação intra e interespecífica entre NGR, foram adaptados bioensaios em sistemas *split-pot* (Martínez-Medina *et al.*, 2017). Tomateiros suscetíveis (cv. Tiny Tim) tiveram as suas raízes divididas para dois vasos de 60 ml cada, contendo solo comercial, areia e vermiculite esterilizados (1,5:1:1). Cada vaso foi inoculado com 200 ovos extraídos a partir de raízes repletas de massas de ovos, submersas em hipoclorito de sódio (0,52%) sob agitação durante 3 minutos (Hussey & Barker, 1973). O inóculo com 200 ovos foi pensado para não ultrapassar a infeção moderada (Robbins *et*

al., 1987). Devido à similaridade morfológica entre as espécies de NGR, e consequentemente a dificuldade em distinguir um da outra quando combinadas, foram feitas combinações a pares, e inoculadas em vasos diferentes. As plantas foram inoculadas com populações das quatro espécies mais comuns, de maneira a testar todas as combinações intra e interespecíficas possíveis. Dessa forma, os tratamentos estabelecidos foram: i) interação indireta, quando a planta teve cada vaso inoculado com uma espécie distinta (ex. vaso "A": *M. hapla*, vaso "B": *M. arenaria*); ii) interação direta, na qual a planta teve cada vaso inoculado com ambas as espécies (ex. vaso "A": *M. hapla* + *M. arenaria*, vaso "B": *M. hapla* + *M. arenaria*); iii) competição intraespecífica, quando a planta teve ambos os vasos inoculados com a mesma espécie (ex. vaso "A": *M. hapla*, vaso "B": *M. hapla*) (Fig. 2). As plantas foram mantidas com temperatura controlada de 25°C e fotoperíodo de 16h por 60 dias, sendo regadas diariamente e fertilizadas uma vez por semana com *Substral* (N:P:K, 6:3:6). Após este tempo, as plantas foram desenvasadas, lavadas e pesadas separadamente, determinando-se o peso fresco da raiz. Depois, foi quantificado o número total de galhas e de massas de ovos por observação ao microscópio estereoscópico. Foram então extraídos os ovos com 0,52% de NaOCl (Hussey & Barker, 1973) e estimado o número de ovos em cada porção de raiz. Com estes valores, foram estimados o fator de reprodução (RF) e a taxa de fecundidade para cada tratamento. Para estimar o RF, foi dividido o número total de ovos (população final) pelo número de ovos inoculados (população inicial), enquanto que a fecundidade foi baseada na divisão do número total de ovos pelo número de massas de ovos (Wesemael & Moens, 2011).



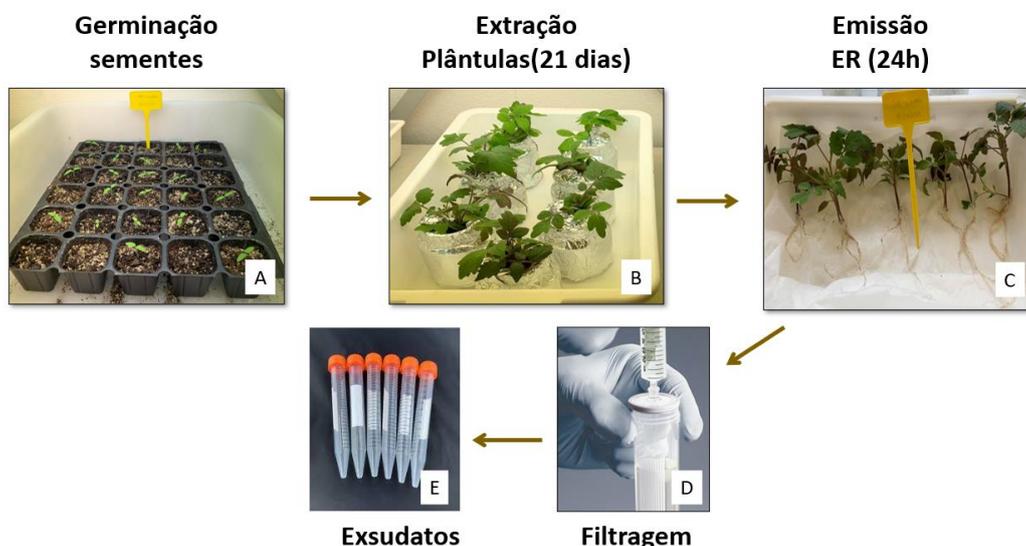
**Figura 2.** Esquema experimental do processo de inóculo de cada tipo de competição: indireta, direta e intraespecífica. (Adaptado de Martinez-Medina *et al.*, 2017).

### 3. Efeito de quimiotaxia de exsudatos radiculares e *nemawater*

#### 3.1 Produção e extração de exsudatos radiculares

Para a realização dos bioensaios descritos em 3.3 e 3.4, foi necessário obter exsudatos radiculares de diferentes cultivares de tomateiro. A obtenção dos exsudatos radiculares foi realizada a partir da adaptação da metodologia descrita por Duarte *et al.*, 2015. Sementes de 5 cultivares de tomateiro, foram semeadas em bandejas subdivididas contendo solo arenoso e areia esterilizada (1:1) (Fig. 3A), sendo estes: cultivar susceptível Tiny Tim, e 4 cultivares de porta-enxertos parcialmente resistentes: Armstrong (Syngenta), Embajador (Rijk Zwaan), Emperador (Rijk Zwaan) e Silex (Fitó). As plantas foram cultivadas em estufa com irrigação diária, temperatura controlada de 25°C e fotoperíodo de 16h por 21 dias. Após este período, as plântulas foram desvasadas, e removido o excesso de solo das raízes (Fig. 3B). Três plântulas da mesma cultivar foram transferidas para copos de vidro cobertos com papel de alumínio, adicionando-se 15ml de água destilada esterilizada a cada copo. Os copos contendo as plântulas foram levados a incubar em sala de cultivo, com condições controladas de temperatura (25°C) e fotoperíodo (16h) durante 24h (Fig. 3C). Após as 24h de emissão de exsudatos radiculares, as suspensões dos copos foram coletadas e filtradas com crivo de 0,22 µm, divididas em alíquotas (Fig. 3D e E) e mantidas a -20°C, para utilização nos

bioensaios (3.3 e 3.4). Foram obtidos exsudatos radiculares de todas os cultivares de tomateiro anteriormente mencionadas.

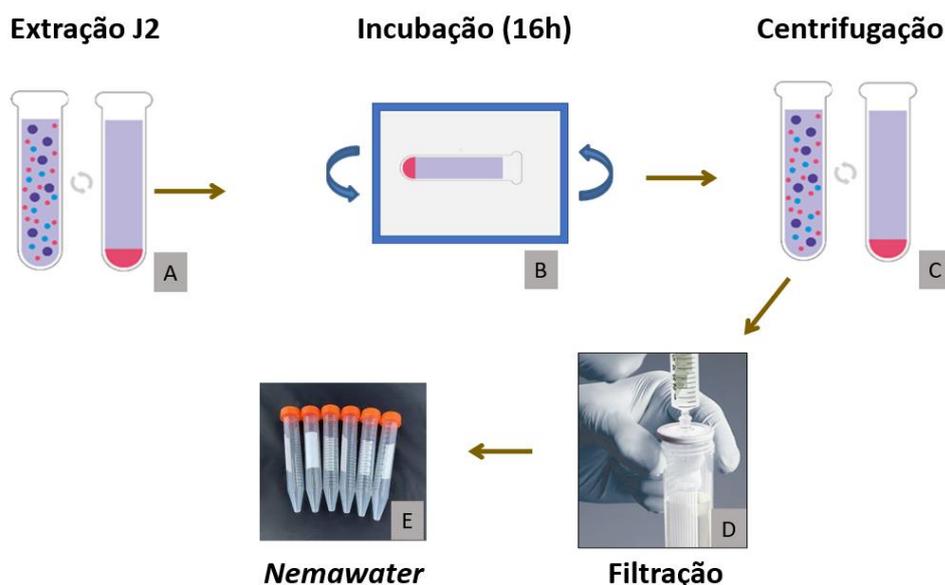


**Figura 3.** Esquema experimental do processo de obtenção de exsudatos radiculares (ER). A – germinação de sementes; B – remoção do excesso de solo das raízes; C – plantas com sistema radicular submerso em água, ao abrigo da luz; D – filtragem de ER (0,22  $\mu\text{m}$ ); E – alíquotas de ER (Adaptado de Duarte *et al.*, 2015).

### 3.2 Produção e extração de *nemawater*

Para a realização dos ensaios da secção 4, foi necessário extrair *nemawater* condicionada pelas várias populações de nemátodes. O termo *nemawater* foi atribuído para ao sobrenadante (água em que os nemátodes ficaram a incubar) na etapa final do processo de extração dos ascarosídeos (Mendy *et al.*, 2017). A obtenção da *nemawater* foi efetuada adaptando a metodologia descrita para a extração de ascarosídeos por Manosalva *et al.* 2015 (Fig. 4). Cerca de 30 0000 J2 foram obtidos a partir de ovos colocados em crivos com 4 folhas de papel e 1 tecido 10 $\mu\text{m}$ . Em caixas de Petri contendo água destilada os ovos ficaram a incubar, no escuro, à temperatura ambiente durante o período de 72h para garantir a eclosão de J2 em número suficiente para a produção de ascarosídeos. Após as 72h as suspensões contendo os J2, foram transferidos para 2 tubos de vidro, nos quais passaram por processo de centrifugação a 5°C, 1500 rpm, durante 10 minutos. A centrifugação teve como objetivo separar os J2 da água em que

foram eclodidos. Para isso, a água dos tubos contendo os J2, foi removida ao máximo possível, de forma a não desfazer o *pellet* de nemátodes no fundo dos tubos. Em seguida foi feita a união dos *pellets* de nemátodes em um tubo, do qual foi novamente centrifugado sob as mesmas condições descritas. Posteriormente, foi retirada a água remanescente, de forma a ajustar o volume para 0,5ml, mantendo o *pellet*. Após o ajuste, foram adicionados 3,5 ml de água destilada esterilizada ao tubo, que foi levado ao agitador para homogeneizar a distribuição dos nemátodes na suspensão. Para estimar o número total de nemátodes, foi feita a contagem do número de J2 em 10 µl, processo repetido para cada um dos tubos. Em seguida os tubos foram levados a incubar em agitador orbital (120 – rpm), durante 16h (*overnight*). Todo este processo teve como objetivo transferir e padronizar os J2 e garantir uma suspensão mais limpa, da qual se pudesse extrair *nemawater*. Após as 16h de incubação, as suspensões contendo a *nemawater* foram filtradas através de um crivo de 0,22 µm, de modo a prevenir contaminações por fungos ou bactérias. As suspensões filtradas, foram divididas em alíquotas de 1 ml e mantidas a -20°C para conservar até seu uso nos bioensaios (3.3 e 3.4). Todo este processo foi repetido para cada isolado de NGR (selecionados virulentos e não-virulentos).



**Figura 4.** Esquema experimental do processo de obtenção de *nemaewater* (NW). A – Centrifugação jovens do segundo estágio (J2); B – Incubação sob agitação constante; C – Centrifugação para recolha das suspensões; D – filtragem das suspensões de NW (0,22  $\mu\text{m}$ ); E – Os círculos a cores dentro dos tubos, representam J2 na suspensão homogeneizada (A e C). As setas indicam a sequência dos processos. A base do tubo destacada em rosa, representa os J2 concentrados (A e C).

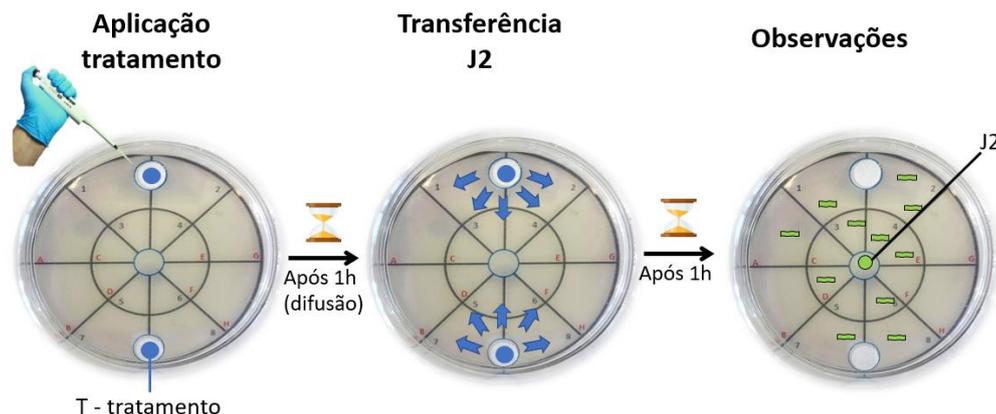
### 3.3. Efeito de exsudatos radiculares e *nemaewater* na atração ou repulsão de J2

Para avaliar os efeitos de quimiotaxia de diferentes exsudatos radiculares (ER) e *nemaewater* (NW) na atração/ repulsão de NGR foram conduzidos ensaios *in vitro*. A metodologia utilizada para o desenvolvimento deste bioensaio, foi baseada na descrita por Wuyts *et al.*, 2006. Jovens de segundo estágio (J2) obtidos como descrito acima (secção II-1), foram expostos a ER e NW, e avaliados os seus efeitos na quimiotaxia em condições de laboratório. Para isso, placas de Petri contendo o fundo recoberto com agarose 0,5% foram marcadas e divididas em um sistema de 16 secções, 2 poços (opostos em paralelo próximo à borda) e uma arena localizada no centro da placa (Fig. 5) As 16 secções foram divididas em zonas de atração e repulsão, baseadas nas secções de maior e menor influência do tratamento aplicado aos poços. Para distinguir as secções e viabilizar as observações, as zonas de atração foram assinaladas com número de 1 a 8, enquanto as zonas de repulsão foram indicadas com letras de A a H. Foram aplicados os

tratamentos com NW e ER, obtidos como descrito acima (3.1 e 3.2). Além disso, também foram feitos controlos positivos e negativos, utilizando cloreto de cálcio  $\text{CaCl}_2$  0,5 M (atrativo) e ácido acético  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1% (repelente) e água destilada (controlo neutro) (Wuyts *et al.*, 2006). A aplicação dos tratamentos consistiu na remoção de parte da agarose, de forma a criar dois poços (Fig. 5), nos quais foram adicionados 15  $\mu\text{l}$  do tratamento (ER ou NW) ou testemunha. As placas foram tapadas e incubadas à temperatura ambiente, durante 2h, no escuro para difusão dos tratamentos na agarose. Vinte J2 foram transferidos individualmente para o centro da placa e levados a incubar durante 45 minutos, à temperatura ambiente no escuro. Após incubação, foram feitas as observações do número de nemátodes e sua secção de localização correspondente. Para cada isolado de NGR, foram feitas 3 repetições para cada tratamento e 3 replicações, para averiguar as possíveis variações práticas. Foram testadas as 4 espécies mais comuns de forma fazer todas as combinações possíveis para testar as diferentes NW e ER e nemátodes. Os dados obtidos, foram analisados através da razão entre o número total de J2 nas zonas de atração dividido pelo o número total de J2 presente nas zonas de repulsão. Tal métrica, permite estimar o *Chemotaxis factor* (Cf)

$$(\text{Cf}) = \frac{\text{atrativo}}{\text{repelente}} = \frac{\sum n^\circ \text{J2 (1-8)}}{\sum n^\circ \text{J2 (A-H)'}}$$

onde resultados menores que 0,5 foi classificado como efeito repulsivo, entre 0,5 e 2,0 zona neutra (sem efeitos evidentes) e para os casos em que o Cf foi maior que 2,0 como zona de atração. Para facilitar a comparação entre a quimiotaxia de diferentes populações de nemátodes, os valores de Cf foram ainda corrigidos por proporção ao valor de Cf médio obtido por exposição à testemunha neutra (água), que foi considerado de valor 1.



**Figura 5.** Esquema do desenho experimental para teste do efeito de *Nemawater* e exsudatos radiculares na Quimiotaxia de nemátodes-das-galhas-radiculares. \* Os círculos e setas azuis representam os poços de aplicação e a difusão dos tratamentos, respectivamente. O círculo verde, indica o local de aplicação dos nemátodes, enquanto os retângulos verdes representam a dispersão dos nemátodes (Adaptado Wuyts *et al.*, 2006).

### 3.4. Efeito de exsudatos radiculares e *nemawater* na atração de J2 de *Meloidogyne javanica* para a raiz

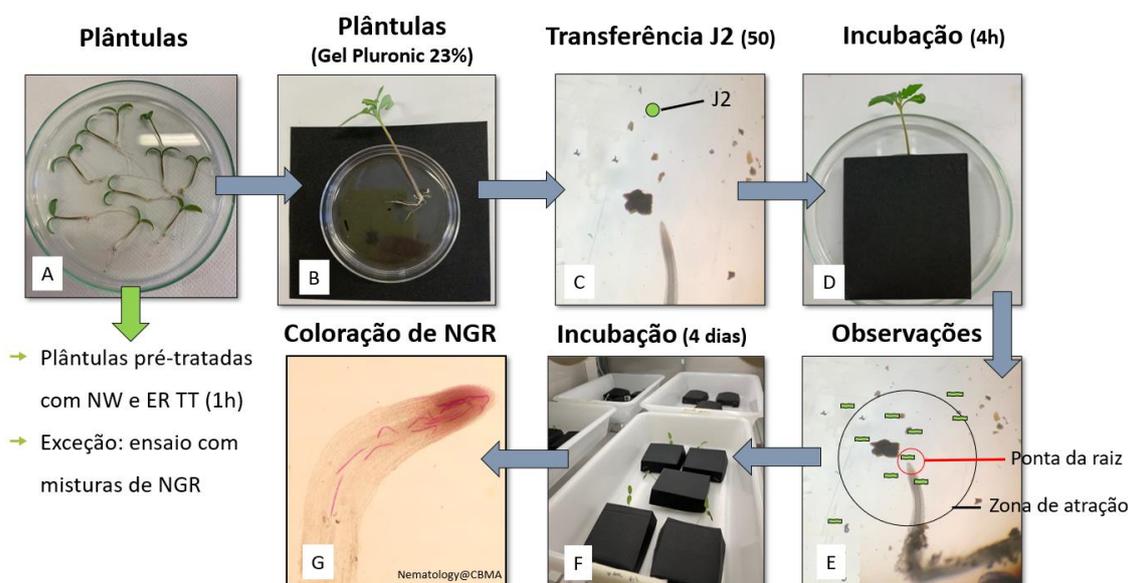
Para avaliar a influência de diferentes exsudatos radiculares (ER) e *nemawater* (NW) na atração de NGR e infecção plantas suscetíveis e parcialmente resistentes, foram conduzidos ensaios *in vitro*, utilizando populações de *M. javanica* original (não- selecionada) ou virulentas para porta-enxertos parcialmente resistentes. Os ensaios foram divididos em 3 grupos: i) efeitos da pré-exposição a ER de plantas das cvs. resistentes Armstrong e Silex e cv. suscetível TT na atração e infecção de *M. javanica* (população original), com o objetivo de averiguar a possível indução de atração e infecção de plantas resistentes por exposição a ER de plantas suscetíveis; ii) efeitos da pré- exposição de cultivares resistentes e suscetível a NW de *M. javanica* (população original e virulentas), para avaliar se a NW de populações virulentas induz a atração e infecção de plantas resistentes pela população original; iii) efeitos, da combinação de diferentes populações de *M. javanica* (população original e virulentas) na atração e

infecção de plantas resistentes e suscetíveis, para avaliar efeitos da interação direta entre nemátodes.

Para estes ensaios, sementes das cultivares Tiny Tim (TT), Silex e Armstrong, foram germinadas em placas de Petri sobre papel de filtro humedecido com água destilada, mantidas ao abrigo da luz sob condições controladas de temperatura (25°C). Após 3 dias, com o surgimento das radículas, as raízes foram parcialmente expostas a luz, de forma a favorecer o seu crescimento. As plântulas permaneceram sob as mesmas condições até apresentarem o primeiro par de folhas, fase utilizada nos ensaios. A metodologia utilizada para o desenvolvimento destes ensaios, foi uma adaptação dos métodos utilizados por (Mendy *et al.*, 2017). Para a realização do ensaio, as plântulas foram tratadas previamente com ER, NW e água destilada (controlo). Uma hora antes dos ensaios, as plântulas tiveram suas radículas submersas dentro de tubos de ensaio contendo ER e NW extraídos anteriormente (3.1 e 3.2) e água destilada (Fig. 6-A). Posteriormente, foram transferidas para placas de Petri e adicionado 8 ml de gel *Pluronic* (23%), até submergir todo sistema radicular (Fig. 6-B). Para cada cultivar e tratamento, foram realizadas 5 repetições. Foi utilizado o gel *Pluronic* (23%), precisamente para simular o ambiente natural do estágio infetivo dos nemátodes (solo) e também permitir as observações, uma vez que é transparente. Outra vantagem do gel *Pluronic*, está associada as condições de polimerização, que por sua vez só acontece com temperaturas acima de 10°C (Wang *et al.*, 2009).

Os J2 em suspensão obtidos de cada população de *M. javanica* foram centrifugados, concentrados em *pellet*, sendo removido o excesso de água. Em seguida foi adicionado 2 ml de gel *Pluronic* 23% (frio/ não polimerizado), agitado e quantificado o número de J2 correspondente a 0,1 ml (x3). Depois de estimado o volume necessário para transferir 50 J2 foi feito o inóculo a 2 cm de distância da ponta da raiz. Para o ensaio do grupo *iii*, relativamente aos tratamentos que havia misturas de nematodes, foi aplicado um volume de suspensão que contivesse 25 J2 de cada isolado da combinação (Fig. 6-C). O número real de J2 por placa foi determinado por observação ao microscópio estereoscópico. Em seguida as placas foram colocadas sobre gelo, a fim de homogeneizar e nivelar o gel *Pluronic* antes de serem levadas a incubar. Para incubar, as placas foram cobertas de forma a abrigar o sistema radicular e manter a incidência de luz na parte aérea (Fig. 6- D). As plantas foram mantidas numa câmara climática, com

fotoperíodo de 16h e temperatura de 25°C. Após 4h de incubação foram quantificados o número de J2 dentro da zona de atração e na raiz (Fig. 6-E). A zona de atração foi estabelecida a partir da marcação de um círculo com 1 cm de diâmetro, no qual teve o seu centro posicionado na ponta da raiz. Após as observações, as plântulas voltaram a ser incubadas sob as mesmas condições por 4 dias (Fig. 6-F).



**Figura 6.** Esquema experimental dos ensaios de quimiotaxia de nemátodes-das-galhas-radiculares envolvendo plantas. A – plântulas após 6 dias de germinação, pré-tratadas a *nemawater* ou exsudatos radiculares de tomateiro suscetível cultivar Tiny Tim; B – plântulas submersas em gel Pluronic 23%; C – Transferências de jovens do segundo estágio (J2); D – raiz ao abrigo da luz; E – J2 dentro da zona de atração + ponta da raiz; F – Incubação (4 dias); G – Nemátodes corados com Fucsina Ácida, com J2 em destaque (Adaptado de Byrd *et al.*, 1983 e Mendy *et al.*, 2017).

Após 4 dias do inóculo, os nemátodes foram corados de vermelho dentro do tecido radicular com Fucsina ácida (Fig. 6-G), seguindo a adaptação do método de Costa *et al.*, 2020. Para facilitar o processo de coloração, as raízes foram transferidas para tubos tipo *Eppendorfs* contendo 0,6 ml de 0,52% de NaOCl<sub>2</sub> (0,5%) e agitado durante 15 segundos. As raízes foram enxaguadas com água para remover o excesso de NaOCl<sub>2</sub>. Posteriormente, as raízes foram submersas em solução corante obtida por diluição de 10,5 ml de uma solução stock (1,75 g Fucsina ácida, 125 ml de ácido acético e 375 ml de

água) em 315 ml de água destilada, que se tinha aquecido até ferver (Bybd *et al.*, 1983). Os tubos contendo as raízes, ficaram a arrefecer a temperatura ambiente. Novamente, as raízes foram enxaguadas, desta vez para remover o excesso da solução corante e foram mantidas em glicerol: ácido láctico (1:1), para conservar as estruturas e os nemátodes até as observações. O número de J2 dentro de cada raiz foi quantificado ao microscópio estereoscópio, sendo estimada a percentagem de infeção.

#### 4. Análise estatística

Os dados foram analisados no software SPSS *Statistics* para Windows, versão 27.0 (Armonk, NY: IBM crop.), usando testes vocacionados para cada tipo de condições experimentais.

Análises usando Modelos Lineares Generalizados (GLM) foram feitas para os bioensaios “Efeito da competição (*Split-pot*)” (II – 2) e “Efeito de exsudatos radiculares e *nemawater* na atração de J2 para a raiz” (II – 3.4). Para avaliar os efeitos da competição intra e interespecíficas entre NGR (*Split-pot*), foram feitas duas análises separadas, uma que testou o tipo de competição e outra que avaliou a identidade do competidor (somente na interação indireta). Os fatores para o tipo de competição foram analisados com os tratamentos: interação intraespecífica (*Self*), interespecífica direta – nemátodes misturados, ou interespecífica indireta – nemátodes de espécies diferentes inoculados em vasos diferentes (interações mediadas através da planta). Na avaliação do efeito do competidor, foi avaliado a interação indireta entre as espécies, baseados na identidade do nemátode e a identidade do nemátode “competidor”. Os parâmetros observados foram: peso da raiz, número de galhas, número de massas de ovos, fator de reprodução, fecundidade e infectividade. Os modelos assumiram distribuição normal e função de ligação identidade. Quando foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), foram construídos os efeitos principais e interações de fatores por pares, utilizando o teste de LSD (diferença mínima significativa). Relativamente ao ensaio de Quimiotaxia (3.4), foram feitos GLMs, para verificar se o número de J2 na zona de atração após 4h de inóculo (variável  $y_1$ ) e o número de J2 dentro da raiz depois de 4 dias (variável  $y_2$ ) variava em função dos tratamentos (variável  $x_1$ : cultivares tratados com exsudatos radiculares, NW e água (controlo neutro) e da identidade dos NGR e dos hospedeiros envolvidos (variável  $x_2$ : interação interespecífica direta e intraespecífica (controlo). Os modelos

também assumiram distribuição normal e função de ligação identidade. Quando foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), foram feitos contrastes dos efeitos principais e interações por pares, através do teste LSD.

Modelos mistos generalizados (GLMM) foram realizados para o ensaio “Efeito de quimiotaxia de exsudatos e *nemawater*” (II – 3.3) para verificar se o Cf (variável  $y$ ) variava em função dos tratamentos (variável  $x_1$ : composto atrativo, composto repelente, ER, NW e água (controlo neutro) e da população de nemátodes (isolados/ virulentos) (variável  $x_2$ ). Neste caso, foi avaliada a resposta assumindo também uma distribuição normal a fatores fixos (tratamentos) e a uma variável aleatória correspondente às repetições dos bioensaios. Para acomodar a análise de um desenho com poucas amostras e com possíveis violações dos pressupostos, foram corridos GLMM com a aproximação de *Satterthwaite* e estimação robusta. Quando se encontraram diferenças significativas, diferenças entre grupos de resposta foram elucidadas pela análise de LSD por pares ( $p < 0,05$ ).

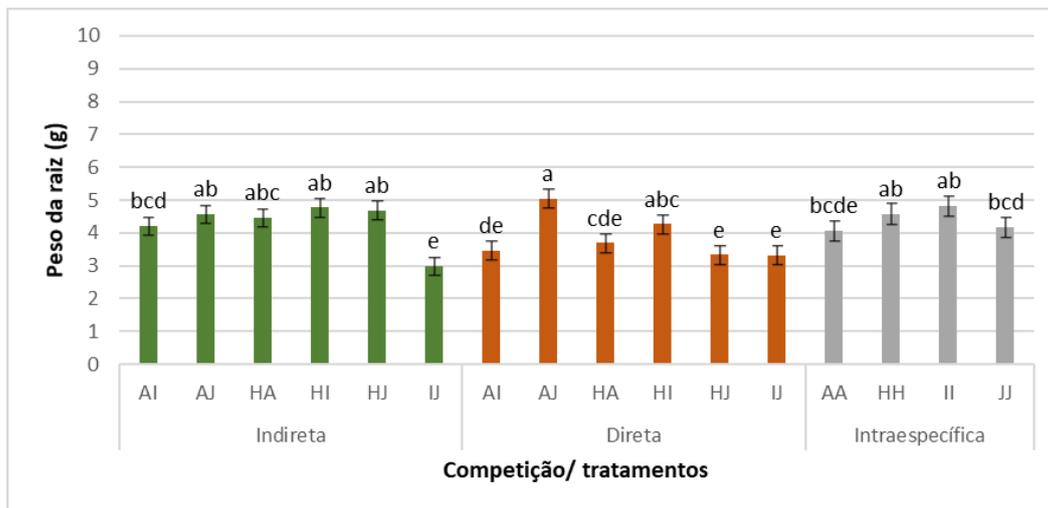
### III.RESULTADOS

#### 1. Competição entre NGR

##### 1.1. Competição intra e interespecífica direta ou indireta entre NGR

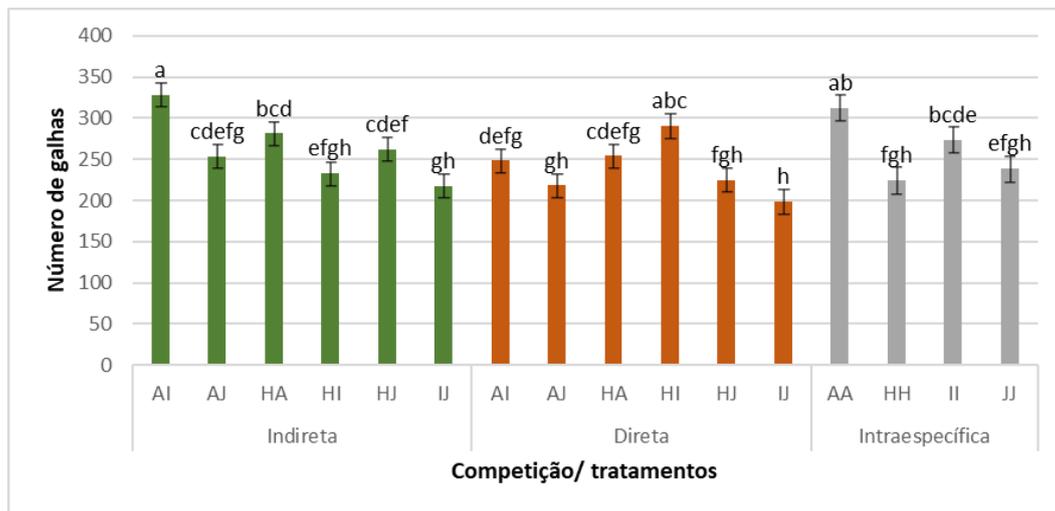
O desenho experimental em *split-pot* permitiu avaliar o efeito das interações intra e interespecíficas entre combinações de pares de NGR. Ao inocular as diferentes espécies misturadas ou separadamente em cada lado do vaso, foi ainda possível determinar efeitos diretos ou indiretos, respetivamente. As categorias de competição subjacentes (por concorrência, por interferência ou química) não foram aqui distinguidas, necessitando a complementação destes ensaios com os restantes ensaios descritos na secção II.

O peso fresco das raízes foi influenciado pela combinação de espécies de *Meloidogyne* ( $p < 0,001$ ), sendo significativamente menor em plantas em que os nemátodes poderiam competir diretamente (populações misturadas antes da inoculação,  $p = 0,009$ ). A interação entre estes dois fatores também resultou em diferenças significativas ( $p = 0,007$ ) (Fig. 7). Assim, o maior peso fresco da raiz foi registado em plantas inoculadas com a mistura de *M. arenaria* com *M. javanica* precisamente num tratamento de interação direta.



**Figura 7.** Peso fresco da raiz (g) em plantas de tomateiro suscetível cv. Tiny Tim após 60 dias de exposição a nemátodes em potencial competição interespecífica indireta (verde), interespecífica direta (laranja) e intraespecífica (cinza). Os tratamentos referem-se à espécie de nemátodes inoculada: A – *Meloidogyne arenaria*, H – *M. hapla*, I – *M. incognita* e J – *M. javanica*. Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o LSD ( $p < 0,05$ ).

O número total de galhas nas raízes foi também influenciado consoante as combinações de espécies de NGR inoculadas ( $p < 0,0001$ ) e com o tipo de competição, sendo menor quando duas espécies foram inoculadas misturadas em ambos os lados da raiz ( $p = 0,005$ ). A interação entre estes dois fatores foi altamente significativa, não se verificando diferenças entre alguns tratamentos para a competição direta ou indireta e tendo os nemátodes de *M. incognita* combinados com *M. hapla* produzido até maiores números de galhas quando inoculados em mistura do que quando inoculados separados. Quando foi inoculada apenas uma espécie, observaram-se maiores danos na raiz provocados por *M. arenaria*, que formou significativamente mais galhas do que *M. hapla* e *M. javanica* (Fig. 8).

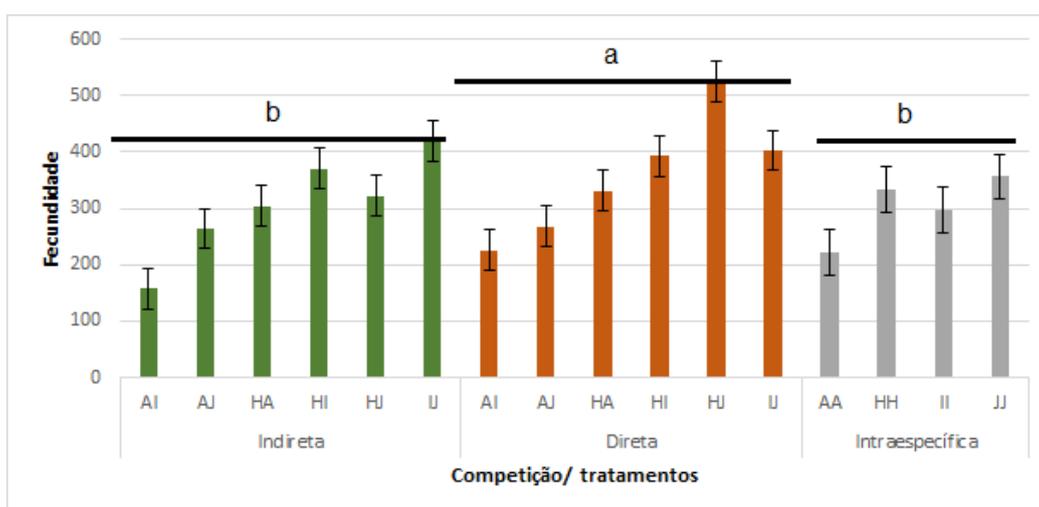


**Figura 8.** Número total de galhas em raízes de tomateiro suscetível cv. Tiny Tim após 60 dias de exposição a nemátodes em potencial competição interespecífica indireta (verde), interespecífica direta (laranja) e intraespecífica (cinza). Os tratamentos referem-se à espécie de nemátodes inoculada: A – *Meloidogyne arenaria*, H – *M. hapla*, I – *M. incognita* e J – *M. javanica*. Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o LSD ( $p > 0,05$ ).

O número de massas de ovos, bem como o fator de reprodução, não foram afetados pela potencial competição entre os nemátodes, apenas tendo sido obtidas diferenças significativas entre os tratamentos de combinações de espécies. De um modo geral, *M. arenaria* e *M. hapla*, em inoculação mono específica ou combinada (quer em mistura, quer separadamente) depositaram um maior número de massas de ovos ( $p < 0,0001$ ). O maior fator de reprodução (estimado em 54x), foi obtido para combinações de *M. hapla* com *M. incognita*; o valor de RF foi em geral superior em tratamentos com inoculação de *M. hapla* (inoculado sozinha ou em combinação com outras espécies), mas não estatisticamente diferente do obtido para inoculação de *M. arenaria* ou *M. javanica* (mono específica), ou para a combinação de *M. incognita* com *M. javanica* ( $p < 0,0001$ ).

A fecundidade foi afetada consoante os tratamentos e o tipo de competição ( $p < 0,01$ ), não tendo sido obtidas diferenças significativas na interação entre estes dois fatores. Assim, ao contrário do número de galhas, indicador do sucesso na infeção e estabelecimento de locais de alimentação na raiz, a fecundidade registada em

tratamentos com potencial competição direta entre as populações de diferentes espécies foi superior à dos outros tratamentos. De modo geral, os nemátodes *M. arenaria* em inoculação mono específica ou combinada (quer mistura, quer separadamente) apresentaram uma menor fecundidade. A maior fecundidade, foi obtida para as combinações de *M. hapla* com *M. incognita*; assim como o fator de reprodução, a fecundidade foi em geral superior em tratamentos com inoculação de *M. hapla* (inoculado sozinho ou em combinação com outras espécies) (Fig. 9).

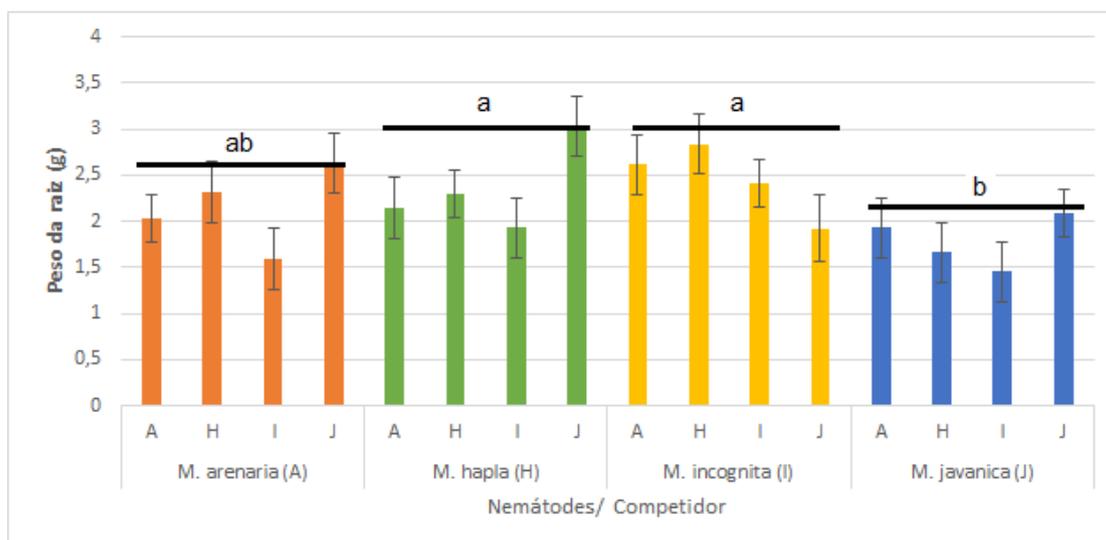


**Figura 9.** Fecundidade em plantas de tomateiro suscetível cv. Tiny Tim após 60 dias de exposição a nemátodes em potencial competição interespecífica indireta (verde), interespecífica direta (laranja) e intraespecífica (cinza). Os tratamentos referem-se à espécie de nemátodes inoculada: A – *Meloidogyne arenaria*, H – *M. hapla* I – *M. incognita* e J – *M. javanica*. Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o LSD ( $p < 0,05$ ).

### 1.2. Efeito das espécies de NGR na interação intra e interespecíficas

Utilizando o mesmo esquema de *split-pot* também foi possível avaliar o efeito das espécies nas interações por pares entre NGR. Aqui somente foram considerados os tratamentos em que os nemátodes de cada espécie foram inoculados em lados separados da raiz, sendo avaliados os efeitos em cada espécie face à identidade do nemátode “competidor”, em competição indireta.

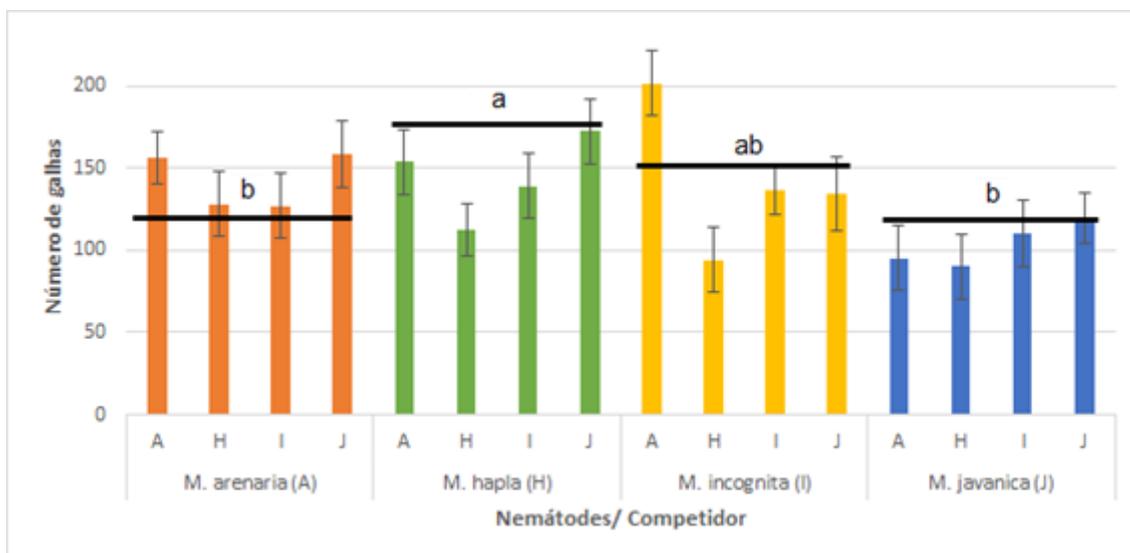
O peso fresco das raízes foi influenciado pelo nemátode e a identidade do nemátode competidor ( $p < 0,01$ ), não tendo sido obtidas diferenças significativas na interação entre nemátode\*competidor. De modo geral, os nemátodes *M. hapla* e *M. incognita* em inoculação mono específica ou combinada apresentaram maior peso fresco das raízes ( $p < 0,01$ ). As raízes com maior peso, foram obtidas para as combinações *M. hapla* com *M. javanica* e *M. incognita* com *M. hapla*, o peso foi em geral superior em tratamentos com inoculação de *M. hapla*, com exceção da combinação com *M. javanica* (Fig. 10).



**Figura 10.** Peso da raiz em plantas de tomateiro suscetível cv. Tiny Tim após 60 dias de exposição aos tratamentos: interação interespecífica indireta e interação intraespecífica. Os tratamentos referem-se às espécies competidoras sendo: A – *Meloidogyne arenaria* (laranja), H – *M. hapla* (verde), I – *M. incognita* (amarelo), J – *M. javanica* (azul). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o LSD ( $p > 0,05$ ).

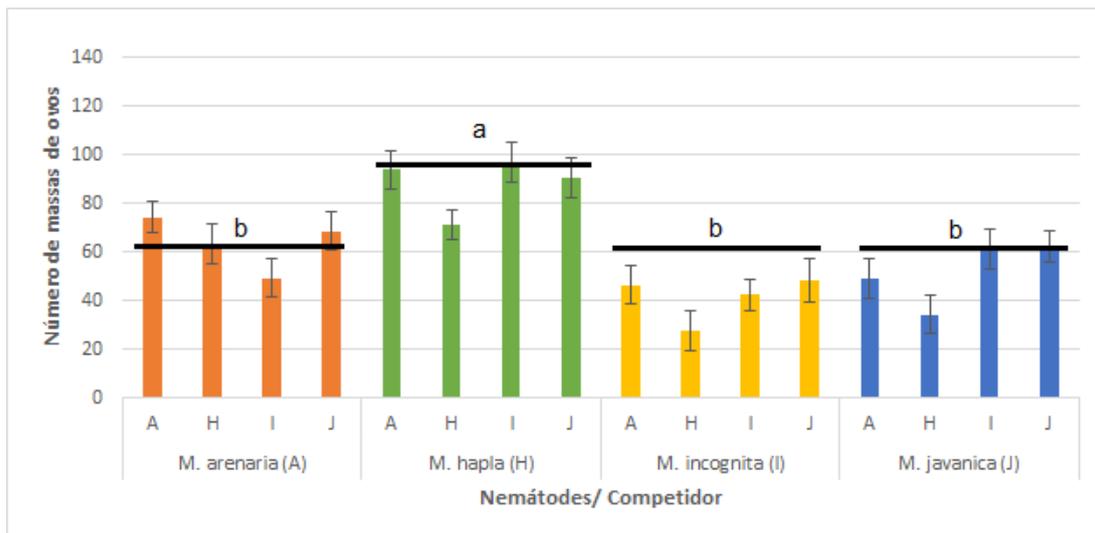
A indução de galhas foi influenciada pelo nemátode e a identidade do nemátode competidor ( $p < 0,005$ ), não tendo sido obtidas diferenças significativas na interação entre nemátode\*competidor. De modo geral, os nemátodes *M. hapla* apresentaram maior número de galhas em inoculação combinada ( $p < 0,003$ ). Os nemátodes que induziram mais galhas, foram obtidas nas combinações *M. hapla* com *M. javanica* e

*M. incognita* com *M. arenaria*. O número de galhas foi em geral superior em tratamentos com inoculação de *M. arenaria* (com inoculação intraespecífica ou combinada), com exceção da combinação com *M. javanica* (Fig. 11).



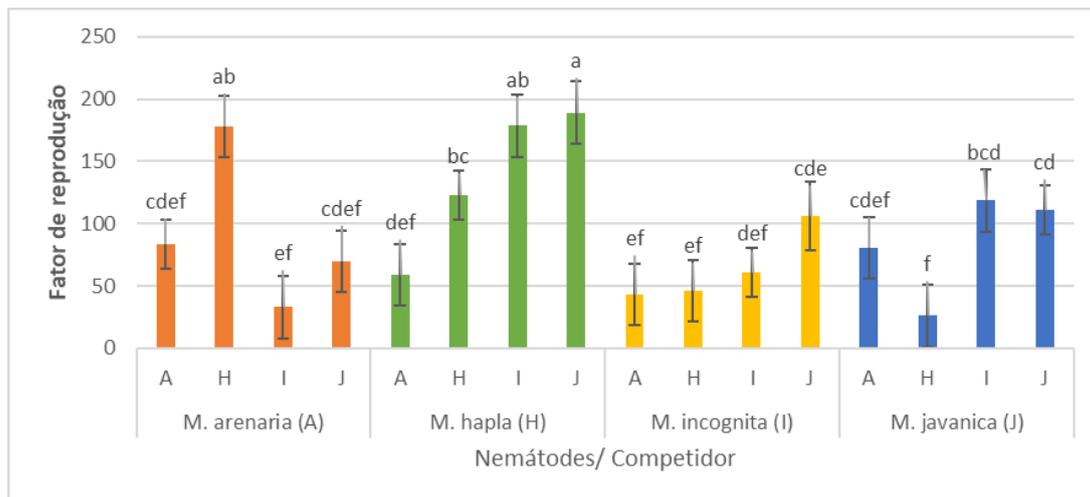
**Figura 11.** Número de galhas em plantas de tomateiro suscetível cv. Tiny Tim após 60 dias de exposição aos tratamentos: interação interespecífica indireta e interação intraespecífica. Os tratamentos referem-se as espécies competidoras sendo: A – *Meloidogyne arenaria* (laranja), H – *M. hapla* (verde), I – *M. incognita* (amarelo), J – *M. javanica* (azul). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o LSD ( $p > 0,05$ ).

O número de massas de ovos foi influenciado pelo nemátode e a identidade do nemátode competidor ( $p < 0,003$ ), não tendo sido obtidas diferenças significativas na interação entre nemátode\*competidor. De modo geral, os nemátodes *M. hapla* apresentaram maior número de massas de ovos em inoculação combinada com outra espécie distinta ( $p < 0,003$ ). Os nemátodes com menor número de massas de ovos, foram obtidas nas combinações *M. incognita* com *M. hapla* e *M. javanica* com *M. hapla* (Fig. 12).



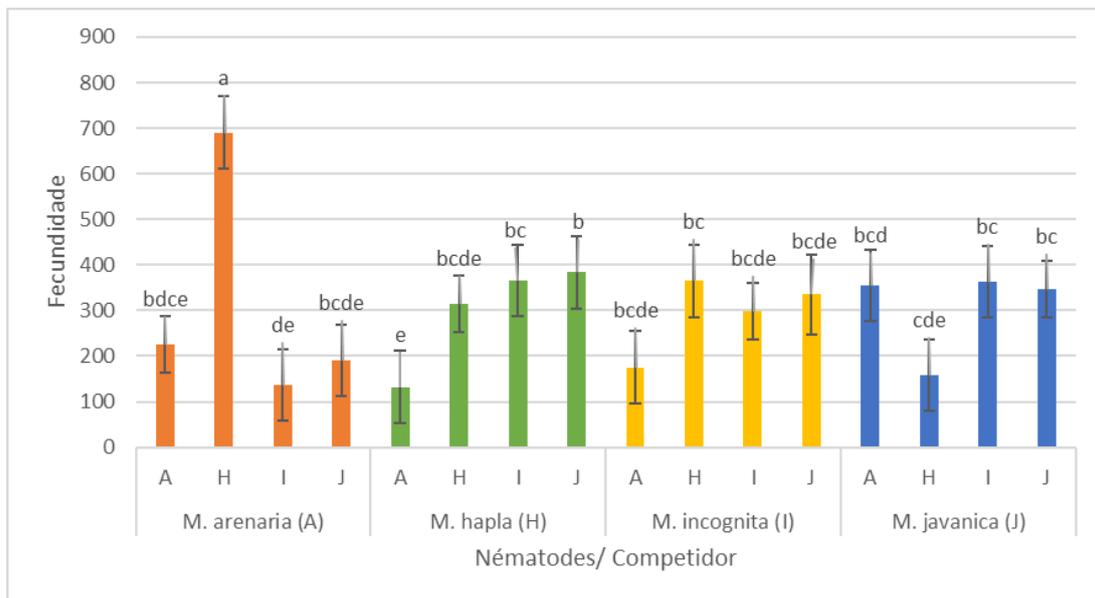
**Figura 12.** Número de massas de ovos em plantas de tomateiro suscetível cv. Tiny Tim após 60 dias de exposição aos tratamentos: interação interespecífica indireta e interação intraespecífica. Os tratamentos referem-se as espécies competidoras sendo: A – *Meloidogyne arenaria* (laranja), H – *M. hapla* (verde), I – *M. incognita* (amarelo), J – *M. javanica* (azul). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o LSD ( $p > 0,05$ ).

O fator de reprodução (RF) foi influenciado pela identidade da espécie de *Meloidogyne* ( $p < 0,05$ ), e seu respetivo competidor ( $p = 0,022$ ), sendo significativamente menor em *M. incognita*. A interação entre estes dois fatores também resultou em diferenças significativas ( $p < 0,001$ ). De facto, a identidade das espécies em potencial competição indireta parece determinar o seu resultado: o Rf de *M. arenaria* manteve-se idêntico em competição com qualquer das espécies; enquanto que os nemátodes da espécie *M. hapla* foram negativamente afetados pela competição com *M. incognita* e com *M. javanica*, que atuaram como facilitadores destas espécies (Fig. 13).



**Figura 13.** Fator de reprodução em plantas de tomateiro suscetível cv. Tiny Tim após 60 dias de exposição aos tratamentos: interação interespecífica indireta e interação intraespecífica. Os tratamentos referem-se as espécies competidoras sendo: A – *Meloidogyne arenaria* (laranja), H – *M. hapla* (verde), I – *M. incognita* (amarelo), J – *M. javanica* (azul). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o LSD ( $p>0,05$ ).

A fecundidade (número de ovos por massa de ovos) das espécies de *Meloidogyne* foi influenciada pela identidade do competidor, sendo o maior valor obtido para *M. hapla*, significativamente superior ao de *M. arenaria* ( $p=0,026$ ). A interação nemátode\*competidor também apresentou diferenças significativas ( $p<0,01$ ). De facto, a identidade das espécies em potencial competição indireta parece determinar o seu resultado: a fecundidade de *M. incognita* manteve-se idêntica em competição com qualquer das espécies; enquanto que os nemátodes da espécie *M. hapla* foram negativamente afetados pela competição com *M. arenaria* (Fig. 14).



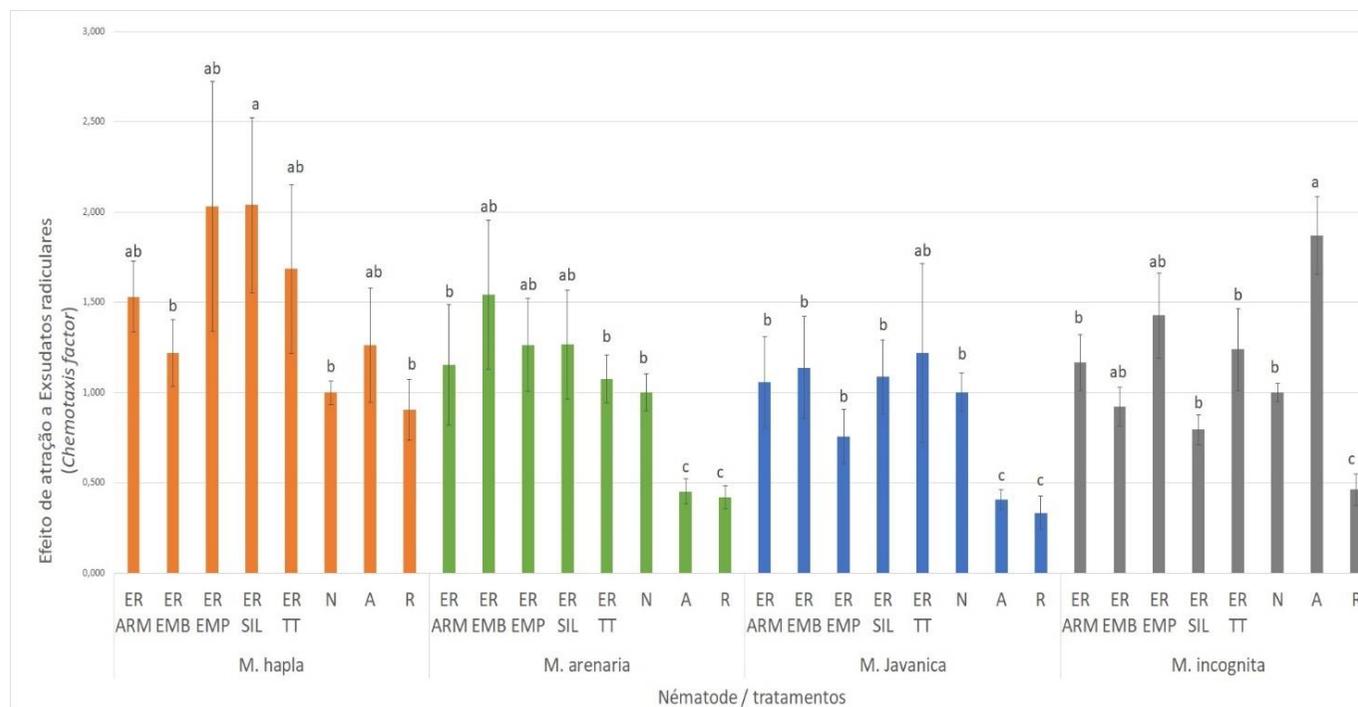
**Figura 14.** A fecundidade em plantas de tomateiro suscetível cv. Tiny Tim após 60 dias de exposição aos tratamentos: interação interespecífica indireta e interação intraespecífica. Os tratamentos referem-se as espécies competidoras sendo: A – *Meloidogyne arenaria* (laranja), H – *M. hapla* (verde), I – *M. incognita* (amarelo), J – *M. javanica* (azul). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o LSD ( $p > 0,05$ ).

## 2. Quimiotaxia de NGR

### 2.1 Efeitos de ER e NW na quimiotaxia de NGR (não virulentos)

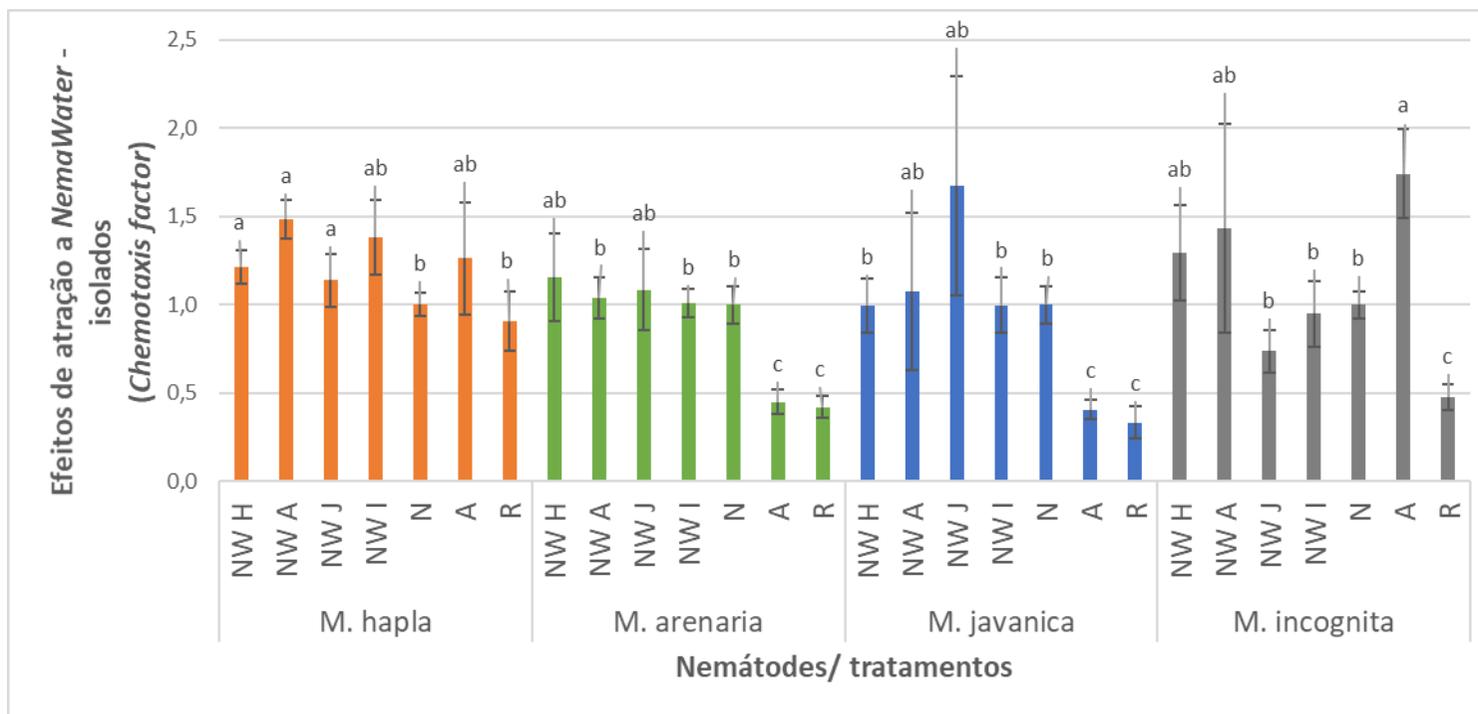
Os ensaios de quimiotaxia *in vitro* permitiram avaliar os efeitos dos ER e NW na atração de NGR, nos isolados não virulentos (secção 2.1), e selecionados virulentos (secção 2.2). Ao aplicar os diferentes componentes químicos (ER e NW), foi possível avaliar o comportamento dos NGR, sobretudo os efeitos de atração ou repulsão dos nemátodes. Ainda foi possível determinar os efeitos de competição por concorrência, por interferência ou competição química na atração e infecção dos NGR (secção 2.3).

O Cf para os isolados não-virulentos das 4 espécies mais comuns de *Meloidogyne* foi influenciado pela presença de exsudatos radiculares ( $p < 0,003$ ), sendo significativamente maior na presença desses exsudatos, independentemente da cultivar de origem. A interação entre estes dois fatores também resultou em diferenças significativas ( $p = 0,001$ ). De modo geral, a atração dos nemátodes demonstrou ser variada e dependente do composto testado, uma vez que o composto que apresentou maior Cf, foi diferente entre as espécies. Apesar de todos os isolados serem atraídos por ER de TT, este efeito foi maior nos nemátodes de *M. javanica* que apresentaram ser mais atraídos por ER de TT, em comparação aos outros componentes testados. De modo interessante, os nemátodes de *M. arenaria* e *M. javanica* foram repelidos pelo composto “atrativo”, apresentando um resultado inesperado e menores valores de Cf. Apesar disso, o mesmo composto atrativo, quando aplicado para os nemátodes de *M. hapla* e *M. incognita*, afetou positivamente a atração dos nemátodes, apresentando maiores valores de Cf (Fig. 15).



**Figura 15.** Efeito das exsudatos radiculares de diferentes cultivares de tomateiro (Armstrong, Embajador, Emperador, Silex e Tiny Tim) na atração de isolados das 4 espécies mais comuns de nemátodes-das-galhas-radiculares, *Meloidogyne* spp. Nemátodes utilizados: *M. hapla*; *M. arenaria*; *M. javanica* e *M. incognita* (variável x1). Componentes químicos (variável x2): Exsudatos radiculares de porta-enxertos parcialmente resistentes cv. Armstrong (“ER ARM”), cv. Embajador (“ER EMB”), cv. Emperador (“ER EMP”), cv. Silex (“ER SIL”) e cv. de tomateiro susceptível Tiny Tim (“ER TT”). Testemunhas neutra, positiva (atrativa) e negativa (repelente): água destilada (“N”), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 0,5M (“A”) e ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) 1% (“R”). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

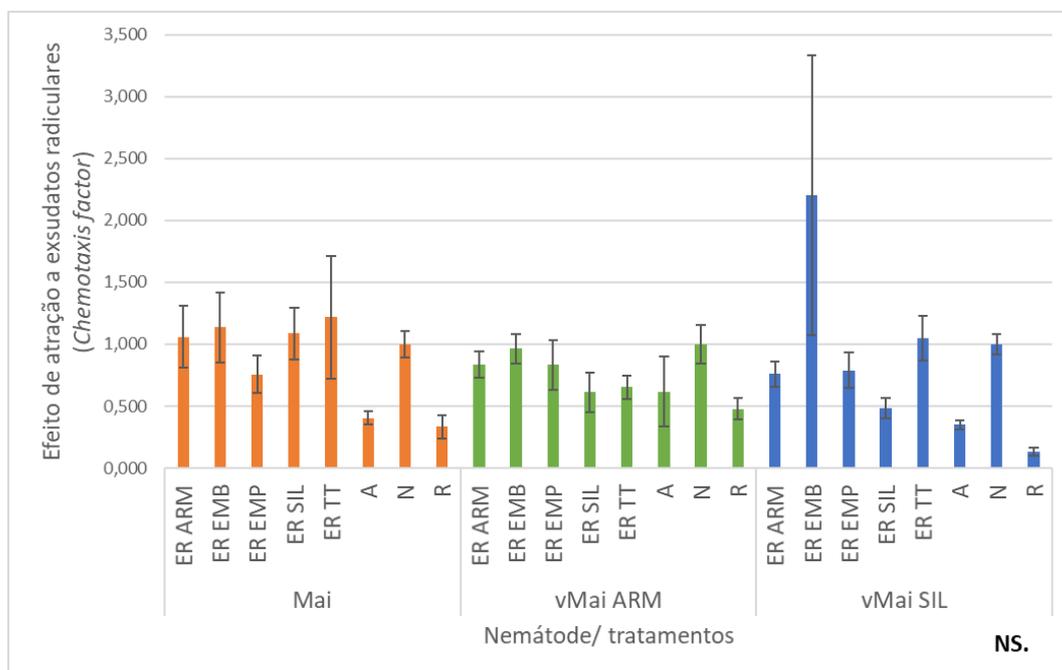
O Cf também foi influenciado pela presença de *nemawater* ( $p=0,003$ ), sendo significativamente maior nos tratamentos com *nemawater*, independentemente do isolado de *Meloidogyne* spp. que a originou. A interação entre estes dois fatores também resultou em diferenças significativas ( $p=0,001$ ). De modo geral, a atração dos nemátodes demonstrou ser variada e dependente do isolado inoculado e da origem da *nemawater*, uma vez que foi diferente entre as espécies. Apesar de todas as *nemawater* terem tido o Cf superior a 0,8 na atração das espécies, este efeito foi menor na *nemawater* de nemátodes de *M. incognita* que apresentaram menor Cf, em comparação com as outras *nemawaters* testadas. Semelhante ao ensaio com ER (Fig. 15), os nemátodes de *M. arenaria* e *M. javanica* também foram afetados negativamente pelo composto “atrativo”. Enquanto que, nemátodes de *M. hapla* e *M. incognita* seguiram o mesmo padrão observado anteriormente (Fig. 16).



**Figura 16.** Efeito da *NemaWater* de nemátodes-das-galhas-radulares, *Meloidogyne* spp. na atração interespecífica: *M. javanica* - H, *M. arenaria* - A, *M. javanica* - J, *M. incognita* - J (variável  $x_1$ ). Tratamentos (variável  $x_2$ ): “NW” indica *NemaWater*, “A” - cloreto de cálcio 0,5 M(atrativo), “R” - ácido acético 1% (repelente), “N” - água destilada (controlo). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

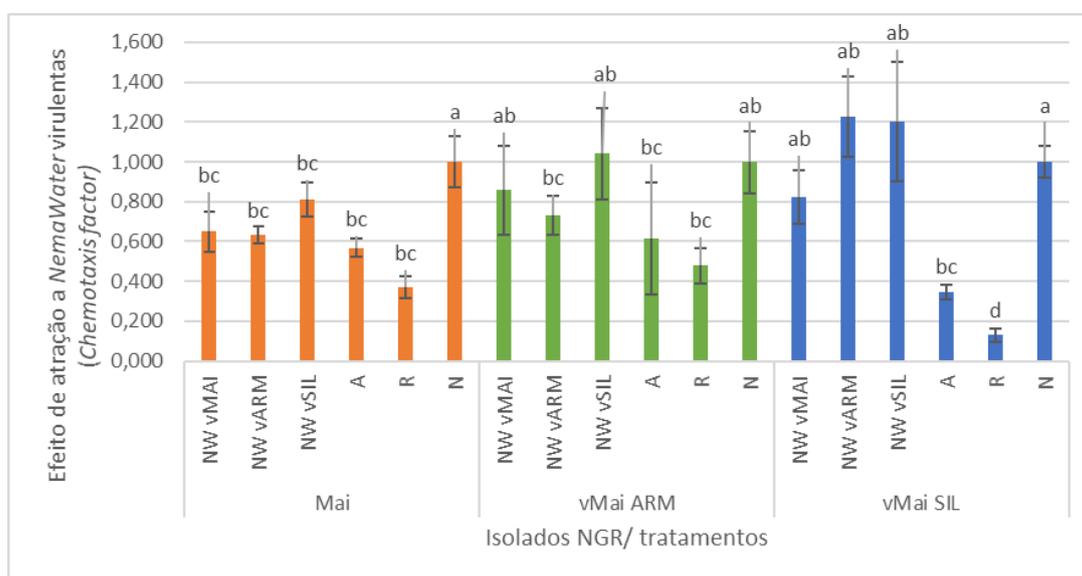
## 2.2. Efeitos de ER e NW na quimiotaxia de NGR (selecionados virulentos)

Não foram observados efeitos dos exsudatos radiculares de diferentes cultivares de porta-enxertos na quimiotaxia de nemátodes para os selecionados virulentos de *M. javanica*, uma vez que não revelaram diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ) (Fig. 17).



**Figura 17.** Efeito de exsudatos radiculares de diferentes cultivares de tomateiro (Armstrong, Embajador, Emperador, Silex e Tiny Tim) na atração de isolados de *Meloidogyne javanica*: “Mai” – isolado de *M. javanica*, “vMai ARM” e “vMai SIL” – selecionados virulentos de *M. javanica* em porta-enxertos parcialmente resistentes cv. Armstrong e cv. Silex, respectivamente (*variável*  $x_1$ ). Componentes químicos (*variável*  $x_2$ ): exsudatos radiculares de porta-enxertos parcialmente resistentes cv. Armstrong (“ER ARM”), cv. Embajador (“ER EMB”), cv. Emperador (“ER EMP”), cv. Silex (“ER SIL”) e cv. de tomateiro susceptível Tiny Tim (“ER TT”). Testemunhas neutra, positiva (atractiva) e negativa (repelente): água destilada (“N”), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,5M (“A”) e ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  1%) (“R”). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

O Cf para os isolados virulentos foi influenciado pela origem da *nemawater* ( $p < 0,05$ ), sendo significativamente menor nos tratamentos atrativo e repelente. A interação entre estes dois fatores também resultou em diferenças significativas ( $p = 0,001$ ). De modo geral, os três isolados de *M. javanica* (original e virulentos) tinham o Cf maior nos tratamentos com *nemawater* e água. Apesar do efeito positivo das *nemawaters*, a atração foi ligeiramente maior nos isolados virulentos, com exceção da combinação entre o isolado virulento em Armstrong com a sua própria *nemawater* (“vMai ARM” + “NW de vARM”), que apresentou o Cf idêntico ao isolado não virulento (Fig. 18).

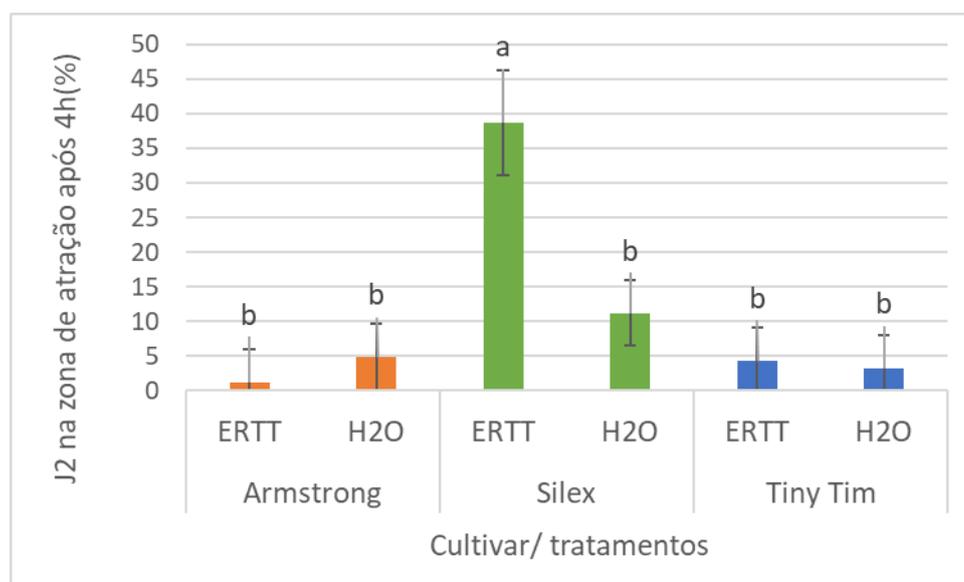


**Figura 18.** Efeito da *Nemawater* de isolados de *Meloidogyne javanica* (original e virulentos) na atração intraespecífica: “Mai” – isolado de *M. javanica*, “vMai ARM e vMai SIL” – selecionados virulentos de *M. javanica* em porta-enxertos parcialmente resistentes cv. Armstrong e cv. Silex, respectivamente (*variável*  $x_1$ ). Tratamentos (*variável*  $x_2$ ): “NW” indica *Nemawater*, “A” – cloreto de cálcio 0,5 M (atrativo), “R” – ácido acético 1% (repelente), “N” – água destilada (controle). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

### 2.3. Efeito de ER e NW na atração e infecção da raiz por NGR

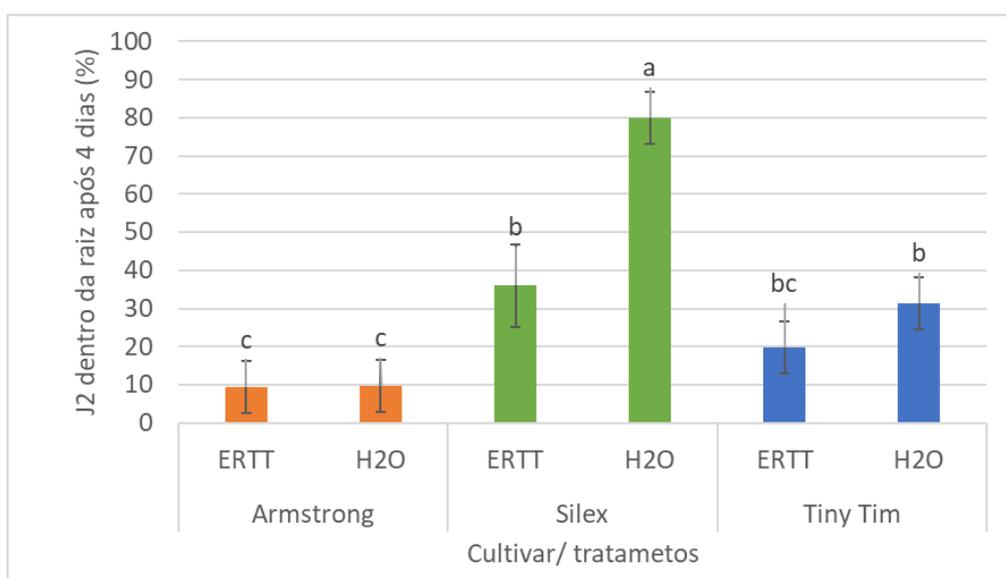
Após a obtenção dos resultados dos ensaios anteriores (2.1 e 2.2), foram testados os efeitos dos ER e das NW na atração e infecção das raízes por *M. javanica*, considerando a população original e as virulentas selecionadas pelos porta-enxertos Armstrong e Silex.

A percentagem de *M. javanica* (J2) na zona de atração foi influenciada pela identidade da planta hospedeira e pela presença de ER da cultivar TT ( $p=0,016$ ), sendo significativamente menor nas cultivares Armstrong e TT. A interação entre estes dois fatores também resultou em diferenças significativas ( $p=0,016$ ). De modo interessante, quando a raiz do porta-enxerto parcialmente resistente Silex foi tratada com ER da TT, foi observada uma percentagem significativamente maior de J2 na zona de atração após 4h da inoculação do que no próprio tomateiro suscetível (Fig. 19). Contudo, não houve influência aparente da presença de ER da TT, para as cultivares Armstrong e Tiny Tim.



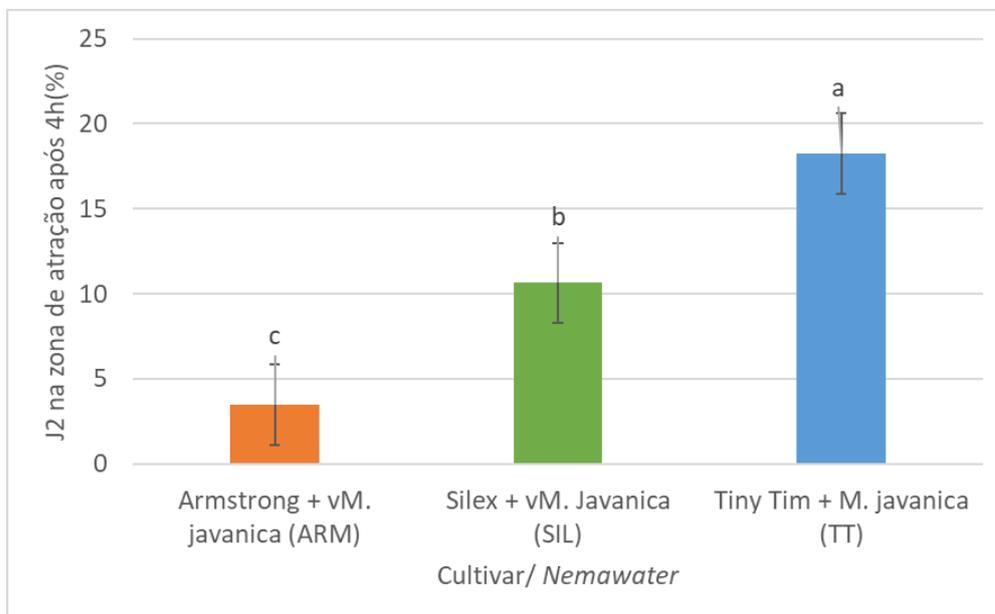
**Figura 19.** Percentagem de jovens no segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* na zona de atração em cultivares de tomateiro susceptível cultivar Tiny Tim (TT) e porta-enxertos Armstrong e Silex, após 4h de incubação aos tratamentos: exsudatos radiculares (ER) de TT e água. Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 3 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p>0,05$ ).

A atração dos NGR não está relacionada ao sucesso da infecção. Aqui, as atrações à zona da raiz após 4 horas do inóculo, não se refletiram numa maior infecção ao fim de 4 dias. A percentagem de *M. javanica* (J2) dentro da raiz após 4 dias foi influenciada pela identidade da planta hospedeira e pela presença de exsudatos radiculares (ER) da cultivar Tiny Tim (TT) ( $p < 0,003$ ). A interação entre estes dois fatores também resultou em diferenças significativas ( $p = 0,022$ ). De modo geral, houve uma baixa percentagem de infecção da raiz, sendo significativamente menor a percentagem de J2 a infetar a cultivar Armstrong, independente do tratamento. As cultivares Tiny Tim e Silex, apresentaram maiores percentagens de J2 dentro da raiz independente dos tratamentos, com destaque para a cultivar Silex tratada com água, que demonstrou ter sido infetada por 80% dos nemátodes (Fig. 20).



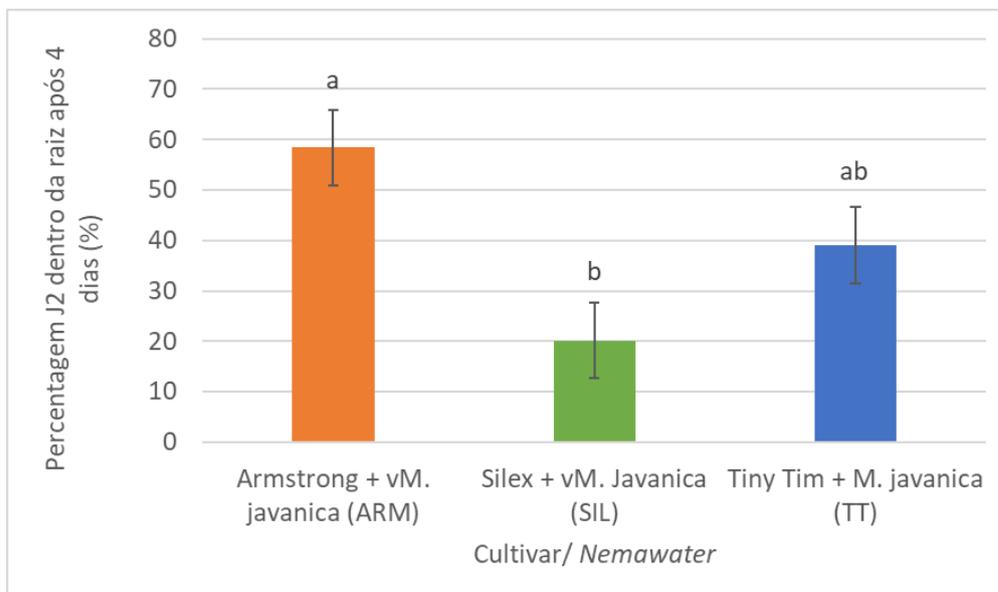
**Figura 20.** Percentagem de jovens no segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* na zona de atração em cultivares de tomateiro suscetível da cultivar Tiny Tim (TT) e porta- enxertos Armstrong e Silex, após 4 dias de incubação aos tratamentos: exsudatos radiculares (ER) de TT e água. Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 3 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

A percentagem de *M. javanica* (J2) na zona de atração foi influenciada pela identidade da planta hospedeira e pela presença de *nemawater* (NW) de nemátodes virulentos selecionados nas cultivares correspondentes ( $p= 0,001$ ). De modo esperado, foram observados mais J2 na zona de atração da raiz de tomateiro da cultivar suscetível (TT) tratado com NW de *M. javanica* mantida em TT 4h após inoculação (Fig. 21).



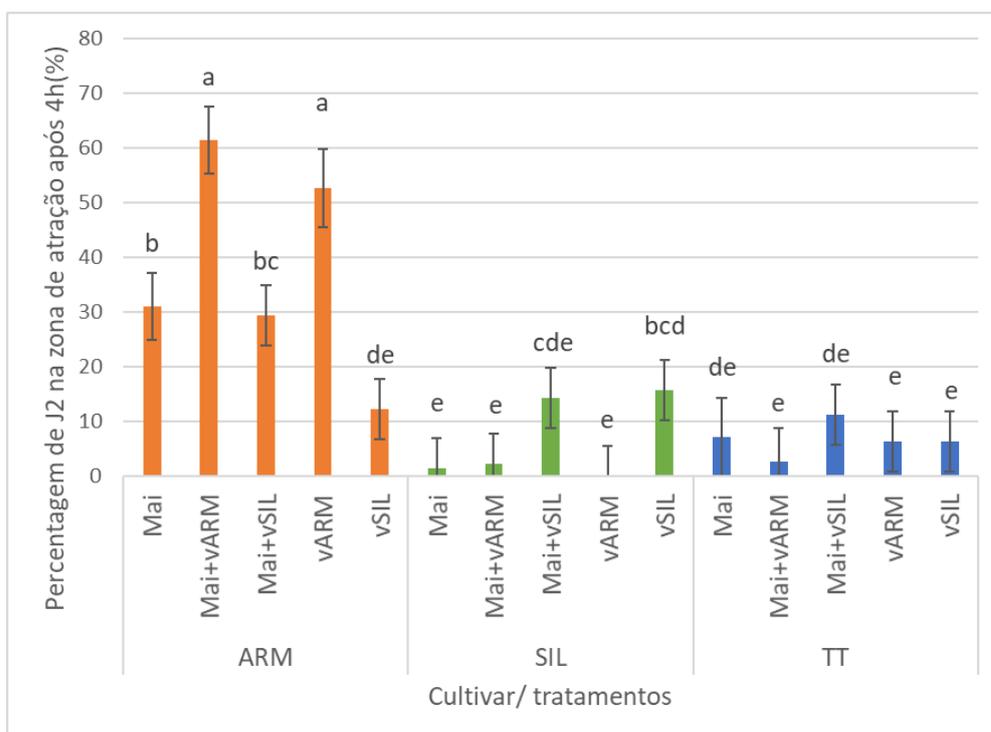
**Figura 21.** Percentagem de jovens de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* na zona de atração em cultivares de tomateiro susceptível cultivar Tiny Tim (TT) e porta-enxertos Armstrong (ARM) e Silex (SIL), após 4h de incubação aos tratamentos: cultivar + *Nemawater* de nemátodes selecionados e virulentos (“v”) correspondentes. Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p>0,05$ ).

No entanto, 4 dias após a inoculação, a percentagem de J2 que infetou a raiz foi maior na cultivar Armstrong do que na cultivar Silex, não havendo diferenças significativas entre a infeção dos porta-enxertos e a do tomateiro suscetível. A percentagem de J2 de *M. javanica* dentro da raiz após 4 dias foi também influenciada pela identidade da planta hospedeira e pela presença de *nemawater* (NW) de nemátodes selecionados correspondentes ( $p= 0,002$ ) (Fig. 22).



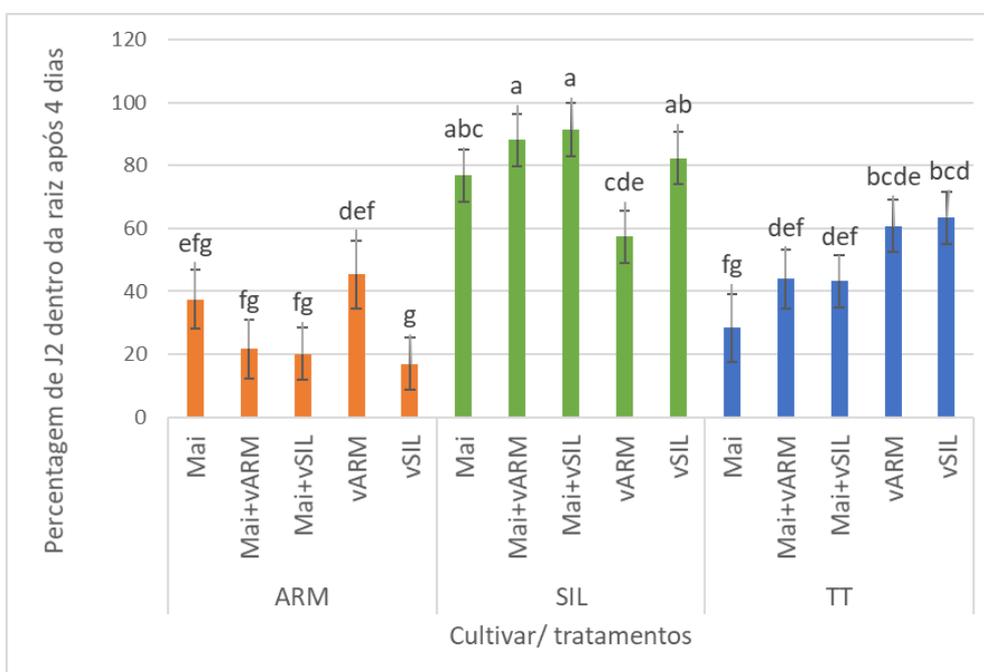
**Figura 22.** Percentagem de jovens de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* dentro da raiz em cultivares de tomateiro porta-enxertos Armstrong (ARM), Silex (SIL) e susceptível cultivar Tiny Tim (TT), após 4 dias de incubação aos tratamentos: cultivar + *Nemawater* de nemátodes selecionados e virulentos (“v”) correspondentes. Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p>0,05$ ).

Quando foram inoculadas as cultivares TT e de porta-enxertos Armstrong e Silex com diferentes populações de *M. javanica*, incluindo populações virulentas selecionadas nesses porta-enxertos, a percentagem de J2 na zona de atração foi influenciada principalmente pela identidade da planta hospedeira ( $p=0,001$ ). A interação deste fator com a combinação de populações de nemátodes inoculados também resultou em diferenças significativas ( $p<0,001$ ). De modo geral, a cultivar Armstrong demonstrou maior efeito de atração de J2 sob os diferentes tratamentos, com exceção da *M. javanica* virulenta em Silex (vSIL). Da mesma forma, houve uma maior taxa de atração de J2 quando as cultivares foram inoculadas com populações de nemátodes selecionadas correspondentes. Além disso, *M. javanica* virulenta em Armstrong (vARM) aumentou a atração de *M. javanica* não virulenta (Mai), quando inoculadas conjuntamente, atraindo em média 60% dos nemátodes (Fig. 23).



**Figura 23.** Efeito da cultivar e tipo de competição em isolados de *Meloidogyne javanica* na atração intraespecífica e interespecífica. Tratamentos (*variável*  $x_1$ ): “ARM” indica cultivar Armstrong, “SIL” – cultivar Silex, “TT” – cultivar Tiny Tim. Tratamentos (nemátodes utilizados): “Mai” – isolado de *M. javanica*, “vMai ARM” e “vMai SIL” – selecionados virulentos de *M. javanica* em porta-enxertos parcialmente resistentes cv. Armstrong e cv. Silex, respectivamente (*variável*  $x_2$ ). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p>0,05$ ).

Mais uma vez, a atração dos NGR não pareceu estar relacionada ao sucesso da infecção. A percentagem de *M. javanica* (J2) dentro da raiz após 4 dias foi influenciada pela identidade da planta hospedeira e das populações inoculadas ( $p < 0,003$ ). A interação entre estes dois fatores também resultou em diferenças significativas ( $p < 0,001$ ). De modo geral, houve maior percentagem de infecção na cultivar Silex, com média superior a 78% para quase todos os tratamentos, com exceção de *M. javanica* virulenta em Armstrong (vARM) aplicada isoladamente (57%). A cv. Armstrong demonstrou ser mais resistente à infecção dos nemátodes, apresentando as menores percentagens de J2 dentro da raiz, com efeito mais negativo para *M. javanica* virulenta em Silex (16%). Na cultivar Tiny Tim, a percentagem de infecção foi maior para as populações virulentas inoculadas separadamente sendo superior a 60%.



**Figura 24.** Efeito da cultivar e tipo de competição em isolados de *Meloidogyne javanica* na infecção intraespecífica e interespecífica. Tratamentos (*variável*  $x_1$ ): “ARM” indica cultivar Armstrong, “SIL” – cultivar Silex, “TT” – cultivar Tiny Tim. Tratamentos (nemátodes utilizados): “Mai” – isolado de *M. javanica*, “vMai ARM” e “vMai SIL” – selecionados virulentos de *M. javanica* em porta-enxertos parcialmente resistentes cv. Armstrong e cv. Silex, respectivamente (*variável*  $x_2$ ). Os resultados representam a média estimada +/- erro padrão de 5 repetições. Colunas com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

## IV. DISCUSSÃO

### 1. Competição direta e indireta entre NGR

Ao analisar os efeitos das interações intra e interespecíficas entre NGR, bem como a influência do tipo de competição (direta e indireta) e o papel da planta hospedeira para o sucesso destes organismos, foi possível identificar efeitos significativos. Assim como observado para outros organismos, incluindo outras espécies de nemátodes, a competição direta e indireta entre NGR podem ser moduladas de acordo com o contexto ecológico em que estão inseridas (Kaloshian & Teixeira, 2019; Manohar *et al.*, 2020). A identidade do competidor e o tipo de competição, mostraram ter papel fundamental no resultado destas interações entre os organismos na rizosfera e dentro das raízes. Assim, e dependendo das espécies de nemátodes, foram detetados efeitos de competição indireta por concorrência ou direta por interferência, mas também - e inesperadamente - facilitação. Os resultados obtidos nos ensaios em *split-pot* não excluem a interação química, quer entre nemátodes quer mediada pela planta.

O menor peso fresco das raízes e a baixa indução de galhas, foram consequências da interação entre os NGR, principalmente na competição direta. De fato, a inoculação de populações misturadas, viabilizou as interações ainda mesmo na rizosfera, afetando negativamente o desenvolvimento desses organismos, sugerindo competição por interferência. Apesar disso, a potencial competição não teve influência direta na reprodução dos nemátodes, nomeadamente no número de massas de ovos e no fator de reprodução. A fecundidade por sua vez, embora tenha sido influenciada pelos tratamentos e tipo de competição, não revelou interação entre os dois fatores. A fecundidade dos nemátodes parece estar relacionada com o número de nemátodes que infetaram, sendo maior em situações de pouca infecção e baixa quando os hospedeiros foram mais infetados. Os mecanismos que podem explicar esses resultados podem ser atribuídos a vários fatores, nomeadamente a fatores bióticos, intrínsecos às espécies dos nemátodes e às plantas hospedeiras (Manohar *et al.*, 2020). A bibliografia é escassa em estudos de competição NGR-NGR, tendo sido realizada investigação sobre interações interespecífica entre NGR e outras espécies de nemátodes e plantas hospedeiras (Wuyts *et al.*, 2006; Yang e Rannala, 2016). Os mecanismos por trás de algumas dessas interações foram identificados, permitindo assim algumas suposições, precisamente para explicar o que pode estar por trás dos resultados aqui encontrados.

As atividades dos NGR nos seus hospedeiros induzem mudanças fisiológicas e morfológicas nas raízes que são utilizadas como indicativos da infecção (Blaxter & Koutsovoulos, 2015; David Mck Byrd *et al.*, 2014). A presença de galhas no sistema radicular das plantas por exemplo, é um dos indicativos mais evidente de uma planta infetada por NGR (Manosalva *et al.*, 2015). Assim, o fato das plantas apresentarem diferenças (ex. peso das raízes, número de galhas) entre os tratamentos envolvendo a mesma espécie e a combinação com outra distinta, pode ser consequência da competição entre as NGR. Apesar disto, estudos anteriores que avaliaram a competição entre *M. chitwoodi* e *P. neglectus*, não encontraram diferenças significativas quanto ao peso das raízes (Umesh *et al.*, 1994). Os autores não observaram nenhuma diferença na infecção dessas espécies isoladas, ou combinadas, sugerindo que a competição intra e interespecíficas no contexto em que estavam inseridas, eram equivalentes (Umesh *et al.*, 1994). Aqui, encontramos algumas diferenças na competição entre NGR-NGR e nos diferentes tipos de competição (indireta, direta e intraespecífica). De fato, alguns estudos têm observado que algumas espécies de NGR apresentam melhores resultados na competição, consoante a identidade do seu competidor, embora de outro género (Chitambar & Raski, 1984; Melakeberhan & Dey, 2003). No presente estudo, a aparente inexistência de uma relação entre o número de galhas e a reprodução, indica que houve menor efeito da competição por concorrência dentro da raiz. A potencial competição por concorrência entre os nemátodes dentro da raiz, pode estar diretamente relacionada às características da planta hospedeira. A capacidade de carga por exemplo, pode ser um dos fatores determinantes no resultado final das interações entre os nemátodes. Isto é, o fato da planta apresentar menos locais de alimentação (aqui avaliados pelo número de galhas), indica haver menos nemátodes a alimentarem-se, assim, cada nemátode terá acesso a mais ou melhor recursos (alimento), o que se reflete em menor efeito de competição e conseqüentemente maior sucesso reprodutivo (Umesh *et al.*, 1994). O nicho ecológico é outro fator que também pode explicar estes resultados, uma vez que está diretamente relacionado com a competição em termos de alimentação entre os organismos (Begon *et al.*, 1997; Hutchinson, 1957). Ou seja, todos os organismos apresentam um conjunto de condições e recursos ideais para o seu desenvolvimento e reprodução: o seu nicho ecológico ideal. Apesar disto, devido a grande pressão de fatores bióticos (competição por exemplo) e abióticos, dificilmente

os organismos estão dentro do nicho ecológico ideal. Por consequência, o nicho ecológico apresenta variabilidade, consoante a capacidade de adaptabilidade intrínseca de cada espécie (Begon *et al.*, 1997). Em termos práticos, o conjunto de condições e recursos atual de cada espécie é classificado como nicho ecológico realizado, ou seja, embora não esteja no máximo do nicho (ideal), os organismos buscam suprir as limitações de forma a garantir o seu desenvolvimento e reprodução (*fitness*) (Begon *et al.*, 1997). Apesar de cada espécie apresentar o seu nicho, existe sobreposição entre as espécies; assim, supõe-se que as populações das diferentes espécies de NGR testadas tenham sido limitadas a usar o mesmo recurso de forma similar, o que poderá ter pronunciado a competição entre estes organismos (Begon *et al.*, 1997; Hutchinson, 1957). Por outro lado, também foi observada a influência da competição por interferência nos resultados finais dessas interações. O fato de *M. arenaria* apresentar menor fecundidade, independentemente do tipo de competição e do seu competidor, sugere que esta espécie será fraca competidora em comparação as outras espécies. Além disso, a planta hospedeira também demonstrou ter papel preponderante no resultado final das interações estabelecidas entre os NGR. Assim, o fato de *M. arenaria* não apresentar maior fator de reprodução ou fecundidade em relação a *M. incognita*, pode estar associado ao sucesso de parasitismo, sendo dependente do nemátode e da planta hospedeira.

*Meloidogyne hapla* também apresentou resultados distintos, consoante o tipo de competição e identidade do competidor. Relativamente ao tipo de competição, *M. hapla*, demonstrou ser mais afetada na competição direta e intraespecífica, do que na competição indireta. Apesar de aparentemente ser um competidor mais fraco, *M. hapla* parece facilitar as outras espécies, ou seja, a presença de *M. hapla* de alguma forma melhora a sua capacidade hospedeira, favorecendo o desenvolvimento das outras espécies de nemátodes. Por exemplo, quando combinada com *M. arenaria*, *M. hapla* apresentou maior número de galhas na competição indireta, sugerindo facilitação (Chitambar & Raski, 1984; Melakeberhan & Dey, 2003). Já foi observado que a interação pode favorecer uma das espécies, relativamente no fato de uma espécie facilitar a infecção subsequente de outra (Melakeberhan & Dey, 2003). Outros padrões também foram observados ao avaliar as interações entre *M. hapla* com *M. incognita* e ou *M. javanica*. No entanto, apesar do Fator de reprodução ter sido maior para *M. hapla*,

a fecundidade não demonstrou diferenças estatísticas, sobretudo nas interações “*M. hapla* + *M. incognita*” e “*M. hapla* + *M. javanica*” (Fig. 9). Isto pode ser um indicativo de que na competição entre estas espécies, há uma grande sobreposição de nichos e uma consequente elevada proporção de indivíduos que atuam como equivalentes, acabando por reduzir o sucesso reprodutivo entre si (Chitambar & Raski, 1984). O mecanismo por trás deste padrão, pode estar associado a sobreposição de nicho alimentar, ou seja, quando há duas espécies com nicho similar e ocupando a mesma raiz, existe uma complementariedade e sobreposição, que acaba por contribuir para atingir a capacidade de carga, mesmo em números relativamente baixos (Hutchinson, 1957; Melakeberhan & Dey, 2003). Os resultados aqui encontrados, reforçam os efeitos de uma espécie sobre a outra em assimetria, ou seja, em situação de competição, ambas as espécies são prejudicadas, mas não são igualmente afetadas (Begon *et al.*, 1997; Brinkman *et al.*, 2008). Quando em competição, uma espécie pode ser mais afetada do que a outra, seja por maior eficiência de exploração de recursos ou ordem de chegada (Chitambar & Raski, 1984; Duncan & Ferris, 1983).

Não se poderá excluir que as diferenças encontradas nos vários parâmetros observados entre espécies de nemátodes estejam associadas a características intrínsecas das espécies, uma vez que a atividade de cada espécie pode ser diferente, especialmente no quesito velocidade de locomoção e entrada na raiz. De acordo com os testes de quimiotaxia, discutidos a seguir (secção 2), algumas espécies apresentaram uma maior velocidade de locomoção do que outras. A ordem de chegada dos nemátodes, já revelou ser determinística no resultado final e na taxa de infeção dos nemátodes subsequentes (Melakeberhan & Dey, 2003). Aqui, o fato de haver diferença entre as populações misturadas ou separadas em vasos diferentes, é indicativo que existe competição por concorrência atuando sobre os NGR. Ou ainda, pode ser reflexo do efeito mediado pela planta, ou uma interação mais direta através de comunicação química (resultando em competição química) por ascarosídeos (Manohar *et al.*, 2020). Apesar destas evidências, não foi possível avaliar com precisão estes efeitos neste ensaio. Ainda assim, este ensaio forneceu informações acerca das interações NGR-NGR, sobretudo aos diferentes tipos de competição (indireta, direta e intraespecífica). Por essa razão, outros ensaios foram realizados para identificar o que poderia está a mediar

as interações entre os NGR-NGR, precisamente a interação/ competição química, mediada pelos ascarosídeos e exsudatos radiculares.

## **2. Efeito de componentes químicos na interação NGR-NGR e plantas**

### **2.1. Efeitos dos exsudatos radiculares**

Ao analisar os efeitos de diferentes exsudatos radiculares na atração e infecção de NGR, foi possível identificar efeitos significativos relevantes. Os resultados obtidos nos ensaios para avaliar os componentes químicos, não eliminam possíveis efeitos diretos da presença dos nemátodes e/ou da planta hospedeira. As interações entre organismos são comumente mediadas por compostos químicos (Srinivasan *et al.*, 2008). Quando pensamos nas interações NGR-plantas, não são diferentes, sobretudo pelo facto dos nemátodes responderem aos exsudatos radiculares (ER) (Manosalva *et al.*, 2015; Reynolds *et al.*, 1970; Williamson, 1998). Aqui, a presença de ER de diferentes cultivares de tomateiro (suscetível e parcialmente resistentes), relevou ter efeito positivo na atração dos 4 isolados não- virulentos de NGR. Assim como esperado, parece ter existido comunicação na rizosfera entre NGR e a planta hospedeira, uma vez que a presença de ER tem papel preponderante na atração dos NGR (Costa *et al.*, 2021; Desmedt *et al.*, 2020). Apesar do papel da comunicação na rizosfera para os NGR ser ainda pouco conhecido, já existem algumas evidências de como as plantas são capazes de atrair/ repelir os nemátodes (Costa *et al.*, 2021; van den Hoogen, *et al.*, 2020; Manohar *et al.*, 2020). Os mecanismos por trás desta quimiotaxia, estão associados a emissão constante de compostos químicos (ER) pelas raízes das plantas, consequências do seu metabolismo primário e secundário (Duarte *et al.*, 2015; Hartmann, 2007). Enquanto que, o processo de repulsão dos nemátodes, pode ser mediado através da captação de ascarosídeos pelas plantas hospedeiras, que metabolizam estes compostos e os libertam com forma e função alterada (Manohar *et al.*, 2020).

O processo de quimiotaxia por ER é o principal e fundamental vetor para que os NGR encontrem os seus hospedeiros. Apesar das plantas inevitavelmente atraírem os NGR, estas apresentam todo um arsenal de defesa contra a infecção (Rivard e Louws, 2008). O arsenal de defesa contra o ataque dos nemátodes, está associado às hormonas vegetais e à expressão de genes associados a síntese de proteínas envolvidas na defesa. O ataque dos NGR, induz mudanças hormonais que

desencadeiam processos químicos de síntese de proteínas de defesa contra os nemátodes (Vieira dos Santos *et al.*, 2017; 2014). Deste modo, embora os porta-enxertos sejam atrativos para os nemátodes, aqui representados pelos ER, estes ainda podem conferir maior resistência/ tolerância a infecção dos NGR. Os resultados obtidos mostram que a presença de ER de TT não teve efeito aparente na atração dos NGR para as cultivares Armstrong e Tiny Tim mas aumentou a atração dos J2 para a cultivar Silex ( $p=0,016$ ). A cultivar Armstrong por sua vez, além de não atrair tanto os J2, também não foi infetada por muitos J2, sugerindo maior resistência a infecção de *M. javanica* (Rumbos *et al.*, 2011). De fato, os resultados demonstraram que a atração dos NGR para a raiz não está relacionada ao sucesso de infecção, podendo por outro lado estar relacionada com a competição química entre os nemátodes. Outro fator importante também, está relacionado com a própria planta hospedeira, que pode impedir a entrada dos nemátodes, seja pela captação de ascarosídeos, transformação e reemissão, repelindo os nemátodes (Manohar *et al.*, 2020), ou simplesmente ter defesas ativadas mais efetivas para determinadas espécies de nemátodes (Vieira dos Santos *et al.*, 2017). A infecção de NGR no sistema radicular na planta hospedeira, ativa uma cascata de reações químicas que induzem o aumento de suas defesas contra estes parasitas (Ho *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 2001). O sistema de defesa da planta pode ser ativado em resposta a padrões de agentes patogénicos, entre os quais estarão substâncias sinalizadoras presentes nos nemátodes, nomeadamente os ascarosídeos (Kaplan *et al.*, 2012; Pungaliya *et al.*, 2009). As plantas apresentam um sistema de proteínas receptoras, que se ligam aos ascarosídeos e desencadeiam uma série de reações químicas, que podem aumentar seu arsenal químico (Xu *et al.*, 2001) e/ou manipular estes compostos, modificando-os para outros ascarosídeos, com diferente ação nos nemátodes (Manohar *et al.*, 2020). Para buscar entender melhor os mecanismos por trás dos resultados obtidos, outros ensaios foram desenvolvidos, desta vez com a simulação da presença de outros nemátodes a partir das *nemawater* (secção 2.2) e também da presença direta dos nemátodes em misturas (secção 2.3).

De acordo com os resultados, não foram detetadas diferenças estatísticas na atração por ER entre os isolados de *M. javanica* não-virulentos e virulentos. Tal fato pode estar associado com características intrínsecas das espécies (Byrd *et al.*, 2014; Manosalva *et al.*, 2015; Smant *et al.*, 2018) ou relacionado a comunicação química na

rizosfera (Costa *et al.*, 2021; Manohar *et al.*, 2020). Ou seja, apesar de serem selecionados virulentos, talvez não tenham acumuladas diferenças suficientes para apresentarem maior ou menor taxa de atração consoante os diferentes tipos de estímulos químicos das distintas cultivares. Por outro lado, a diferença entre os isolados virulentos, e não virulentos, pode ser mais expressiva, quando estes já estejam dentro da raiz.

## **2.2 Efeito da *nemawater* (ascarosídeos) na atração e infecção de NGR**

Além dos ER, os ascarosídeos são outros fatores importantes das interações NGR- NGR e NGR-plantas (Kaplan *et al.*, 2012). De fato, alguns estudos têm observado os efeitos dos ascarosídeos no comportamento de outros nemátodes ou na ativação do sistema de defesa das plantas hospedeiras (Manohar *et al.*, 2020; Manosalva *et al.*, 2015). No presente estudo, os ascarosídeos aqui representados por *nemawater* (NW), demonstraram ter efeito na atração e infecção da raiz de J2 de *M. javanica*. A cultivar Armstrong apresentou maior número de J2 dentro da raiz após os 4 dias, sugerindo maior infecção dos nemátodes. Assim, é possível inferir que a aplicação combinada da cultivar Armstrong com a NW de *M. javanica* virulenta (selecionada em Armstrong), facilitou a infecção de *M. javanica* não virulenta. De toda forma, o resultado final destas interações entre NGR e plantas, dependem do contexto ecológico, sendo dependentes da identidade das populações em interação e a planta hospedeira. É importante salientar que a maior resistência ou tolerância parece estar associada principalmente a baixa taxa de reprodução ou mitigação dos efeitos oriundos da infecção por NGR (Rivard e Louws, 2008; Rumbos *et al.*, 2011). Desse modo, o facto da *M. javanica* (não virulenta) ter apresentado maior taxa de infecção na cultivar de porta-enxerto Armstrong (parcialmente resistente), não vai implicar necessariamente o sucesso do desenvolvimento destes organismos (Williamson, 1998). Assim como todos os organismos, o sucesso dos nemátodes está associado ao desenvolvimento até ao estágio adulto e reprodução com sucessão de sua prole (Serenio e Danchin, 2014; Smant *et al.*, 2018). As cultivares hipersensíveis, por exemplo, são infetadas inicialmente pelos nemátodes, mas depois causam necrose dos locais de alimentação, pelo que os nemátodes morrem, mesmo até já depois de terem formado as galhas (Wesemael & Moens, 2011). Entretanto, maior taxa de infecção, pode ser um indicativo de seleção de

virulência ao longo de gerações subsequentes, causado pela pressão seletiva exercida pelos porta-enxertos parcialmente resistentes, como exposto anteriormente. Daí que seja importante entender as interações entre NGR, e o potencial risco que o uso inadequado de porta-enxertos pode representar na seleção de virulência e suas consequências futuras para o controle destes organismos.

Considerando estes resultados dos ensaios 2.1 e 2.2, relativamente aos efeitos que os ER e a NW ocasionaram nas interações NGR-NGR e NGR-planta, outro ensaio foi realizado para verificar o efeito direto dos NGR e dos porta-enxertos (secção 2.3). Ao contrário dos ensaios anteriores, em que a presença de outro nemátode (possível competidor) foi simulada a partir das NW, enquanto a presença de hospedeiros, foi simulada com ER, aqui foram avaliados efeitos diretos causados pelos próprios nemátodes em coexistência.

### **2.3 Efeitos diretos nas interações entre NGR**

Considerando os resultados dos ensaios anteriores (2.1 e 2.2), relativamente aos efeitos dos exsudatos radiculares e *nemawater* nas interações entre os NGR, foram analisados os efeitos diretos da presença dos nemátodes (em coexistência) na atração e infecção de NGR, onde foi possível identificar efeitos relevantes significativos. O efeito direto das interações entre nemátodes em coexistência já tinha sido investigado em outros estudos, essencialmente envolvendo espécies de nemátodes de géneros distintos. Foram identificados efeitos de: competição por interferência (Gay e Byrd, 1973; Umesh *et al.*, 1994), competição por concorrência (Herman *et al.*, 1988) e facilitação (Brinkman *et al.*, 2008; Chitambar e Raski, 1984). No entanto, ainda existe défice de conhecimento quando pensamos nas interações entre nemátodes do género *Meloidogyne* (Keating *et al.*, 2010; Melakeberhan & Dey, 2003). Por essa razão, estudar e entender melhor como estas interações ocorrem e quais mecanismos associados, tem sido o foco de muitos estudos. A identidade da planta hospedeira teve maior influência na percentagem de atração e infecção dos NGR e, em concordância com resultados anteriores, não houve relação aparente entre a atração e infecção dos NGR.

Apesar da *nemawater* simular presença dos nemátodes (secção 2.2), o efeito direto na presença do nemátode tem um resultado diferente. Tal diferença de efeito, pode estar associado as condições de produção da *nemawater*, em que foi incubado um

elevado número de J2 em tubos contendo apenas água desionizada, que poderá ter potenciado comunicação difusa destes fitoparasitas sem fonte de alimento, em interações intraespecíficas (Mendy *et al.*, 2017). Enquanto que na presença direta de nemátodes, houve outras interações interespecíficas, relativamente à presença de outras espécies de nemátodes e de uma potencial planta hospedeira. O contexto ecológico em que os nemátodes estão inseridos, já demonstrou ser determinístico no quesito produção e reação aos ascarosídeos (Jagdale *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 1999). A produção dos ascarosídeos pode ser diferente consoante o estado fisiológico dos nemátodes e características do meio, seja por presença de outra espécie ou diferentes hospedeiros (von Reuss *et al.*, 2012; Yamada *et al.*, 2010). Aqui, a cultivar Armstrong, atraiu mais J2 quando comparado às outras cultivares. Além disso, houve também maior tendência de atração dos NGR para as cultivares com as quais teriam maior compatibilidade. Embora a percentagem de atração tenha sido maior na cultivar Armstrong, a infeção foi maior nas cultivares Silex e TT. Os mecanismos por trás destes resultados, podem estar associados a seleção prévia dos nemátodes virulentos nas cultivares. Isto é, o facto dos isolados terem sido reproduzidos em cultivares diferentes, pode acabar por gerar certa preferência ou maior atração a cultivar correspondente, sugerindo especificidade. A especificidade de alvo, é um fenómeno comumente encontrado em diversos organismos, especialmente em organismos parasitas (Mitchum *et al.*, 2013; Smant *et al.*, 2018). O processo de co-evolução e adaptação na relação parasita-hospedeiro, pode criar dependência ou preferência por determinadas espécies hospedeiras (Anderson e May, 1982; Begon *et al.*, 1997). Ou seja, a maior atração de nemátodes para cultivares correspondentes, pode estar associada à “memória” destes parasitas, sendo mais atraídos por sinais químicos de seu hospedeiro original. Contudo, o facto da atração na mistura entre isolados não-virulentos e virulentos em Armstrong, serem idênticos à atração do isolado virulento, sugere comunicação química entre os diferentes isolados: em exposição a uma população virulenta, uma população não virulenta pode ser atraída para a raiz. Esta influência pode ter sido consequência da emissão de ascarosídeos com papel de atração e que sejam interpretados como atrativos numa comunicação interespecífica (Diaz *et al.*, 2014; Macosko *et al.*, 2009), sinalizando a deteção de um potencial hospedeiro. A confirmar-se noutros estudos e condições experimentais, estes efeitos poderão pronunciar as repercussões da seleção

para a virulência de NGR exercida pelos porta-enxertos de tomateiro. Apesar disto, e ainda que tenha aumentado a atração para raiz, esta influência de uma população sobre outra de uma espécie diferente não parece ter efeitos relevantes na infecção. Os processos bioquímicos de infecção da raiz, descritos sumariamente acima, resultarão de uma comunicação e interação mais fina entre os nemátodes e os seus hospedeiros, que terão ofuscado efeitos de interação entre nemátodes. É importante o desenvolvimento de novos estudos que busquem identificar e entender melhor como os ascarosídeos podem mediar as interações entre os NGR e com a potencial relação destes componentes nas interações NGR-planta.

### **3. CONCLUSÕES**

Os resultados deste estudo comprovam que as interações entre NGR-NGR e NGR-planta podem ser mediadas por componentes químicos (exsudatos radiculares e *nemawater*), como também realça o papel da planta hospedeira nestas relações. Também permite concluir que o resultado final das interações entre os NGR e a planta depende do contexto ecológico em que estão inseridas. A identidade dos nemátodes, o seu potencial competidor e o tipo de competição são determinantes para o sucesso dos nemátodes. Também, concluímos que a competição entre os NGR, pode ser mediada através da planta e, ainda, que poderá haver também facilitação entre populações de espécies diferentes.

Foi ainda possível verificar que os exsudatos radiculares são fundamentais para as interações entre NGR-planta, sobretudo no efeito que exsudatos radiculares de uma cultivar suscetível podem ter para cultivares parcialmente resistentes, no que toca o aumento da atração de nemátodes. Ainda, certificamos que a atração e infecção dos nemátodes são variáveis independentes, uma vez que a maior atração não refletiu em maior infecção. Também foi constatado o potencial risco que populações virulentas podem exercer sob outras populações não virulentas, essencialmente na comunicação que leva ao aumento de atração mesmo para uma cultivar parcialmente resistente. Além do mais, ratificamos a variabilidade e maior resistência em cultivares parcialmente resistentes, principalmente a cultivar Armstrong, que apresentou baixa atração e infecção aos nemátodes. Será preciso aprofundar o conhecimento sobre estas inesperadas interações na rizosfera, para melhor servir e prever possíveis consequências

do uso da enxertia, que vem sendo uma prática de gestão cada vez mais utilizada para o controlo de pragas e doenças de origem edáfica em várias culturas.

Este estudo contribuiu para o conhecimento acerca das interações entre NGR-NGR e NGR-planta, que podem ser úteis para entender melhor a ecologia destes agentes fitopatogénicos. Trabalhos futuros, que busquem mais detalhes sobre o papel dos componentes químicos nas interações nemátodes-nemátodes e plantas, devem explicar os mecanismos que envolvem estas relações. A caracterização e síntese artificial destes compostos por exemplo, pode servir para o desenvolvimento de novas práticas de controlo destes organismos em campos infestados.

## V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altieri, M. A., & Liebman, M. (1986). Insect, weed and plant disease management in multiple cropping systems. In *Multiple Cropping Systems*, 183–218.
- Anderson, R. M., & May, R. M. (1982). Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology*, *85*, 411–426.
- Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Bellisai, G., Brancato, A., Brocca, D., Bura, L., Byers, H., Chiusolo, A., Court Marques, D., Crivellente, F., De Lentdecker, C., Egsmose, M., Erdos, Z., Fait, G., Ferreira, L., Goumenou, M., Greco, L., Ippolito, A., Istace, F., Jarrah, S., Kardassi, D., Leuschner, R., Lythgo, C., Magrans, J. O., Medina, P., Miron, I., Molnar, T., Nougadere, A., Padovani, L., Morte, J. M. P., Pederson, R., Reich, H., Sacchi, A., Santos, M., Serafimova, R., Sharp, R., Stanek, A., Streissl, F., Sturma, J., Szentes, C., Tarazona, J., Terron, A., Theobald, A., Vagenende, B., Verani, A., Villamar-Bouza, L. (2018). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chlorothalonil. *EFSA Journal*, *16*, 1–40.
- Begon, M., Harper, J. L., & Townsend, C. R. (1997). Ecology: individuals, populations and communities. In *The Journal of Applied Ecology* (Vol. 3).
- Blaxter, M., & Koutsovoulos, G. (2015). The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*, *142*, 26–39.
- Brinkman, E. P., Duyts, H., & van der Putten, W. H. (2008). Interactions between root-feeding nematodes depend on plant species identity. *Soil Biology and Biochemistry*, *40*, 2186–2193.
- Brown, C. R., Mojtahedi, H., Santo, G. S., & Williamson, V. M. (1997). Effect of the *Mi* Gene in tomato on reproductive factors of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla*. *Journal of Nematology*, *29*, 416–419.
- Byrd, D. Mck., & Opperman, C. H. (1998). *Caenorhabditis elegans* : a genetic guide to parasitic nematode biology. *Journal of Nematology*, *30*, 299–308.
- Byrd, D. W., Kirkpatrick, T., & Barker, K. R. (1983). An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, *15*, 142–143.

- Byrd, David Mck, Jones, J. T., Opperman, C. H., Kikuchi, T., & Danchin, E. G. J. (2014). Signatures of adaptation to plant parasitism in nematode genomes. *Parasitology*, *142*, 1–14.
- Chitambar, J. J., & Raski, D. J. (1984). Reactions of grape rootstocks to *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology*, *16*, 166–170.
- Choe, A., Von Reuss, S. H., Kogan, D., Gasser, R. B., Platzer, E. G., Schroeder, F. C., & Sternberg, P. W. (2012). Ascaroside signaling is widely conserved among nematodes. *Current Biology*, *22*, 772–780.
- Cortet, J., Vauflery, A. G.-D., Poinso-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., & Cluzeau, D. (1999). The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology*, *35*, 115–134.
- Costa, S. R., Chin, S., & Mathesius, U. (2020). Infection of *Medicago truncatula* by the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* does not require early nodulation genes. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1–13.
- Costa, S. R., Pin Ng, J. L., & Mathesius, U. (2021). Interaction of symbiotic rhizobia and parasitic root-knot nematodes in legume roots: From molecular regulation to field application. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *34*, 470–490.
- Desmedt, W., Mangelinckx, S., Kyndt, T., & Vanholme, B. (2020). A Phytochemical Perspective on Plant Defense Against Nematodes. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1–25.
- Diaz, S. A., Brunet, V., Lloyd-Jones, G. C., Spinner, W., Wharam, B., & Viney, M. (2014). Diverse and potentially manipulative signalling with ascarosides in the model nematode *C. elegans*. *BMC Evolutionary Biology*, *14*, 1–8.
- Duarte, A., Maleita, C., Abrantes, I., & Curtis, R. (2015). Tomato root exudates induce transcriptional changes of *Meloidogyne hispanica* genes. *Phytopathologia Mediterranea*, *54*, 104–108.
- Duncan, L. W., & Ferris, H. (1983). Validation of a model for prediction of host damage by two nematode species. *Journal of Nematology*, *15*, 227–234.
- Estores, R. A., & Chen, T. A. N. (1972). Interactions of *Pratylenchus penetrans* and

- Meloidogyne incognita* as coinhabitants in tomato. *Journal of Nematology*, 4, 170–174.
- Gay, C. M., & Bird, G. W. (1973). Influence of concomitant *Pratylenchus brachyurus* and *Meloidogyne* spp. on root penetration and population dynamics. *Journal of Nematology*, 5, 212–217.
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68, 2831–2846.
- Herman, M., Hussey, R. S., & Boerma, H. R. (1988). Interactions between *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus brachyurus* on soybean. *Journal of Nematology*, 20, 79–84.
- Ho, J., Weide, R., Ma, H. M., Wordragen, F. Van, Lambert, K. N., Koornneef, M., Zabel, P., & Williamson, V. M. (1992). The root-knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato: construction of a molecular linkage map and identification of dominant cDNA markers in resistant genotypes. *The Plant Journal*, 2, 971–982.
- Hussey, R. S., & Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Report*, 57, 1025–1028.
- Hutchinson, G. E. (1957). Concluding Remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 22, 415–427.
- Jagdale, G. B., Kamoun, S., & Grewal, P. S. (2009). Entomopathogenic nematodes induce components of systemic resistance in plants : Biochemical and molecular evidence. *Biological Control*, 51, 102–109.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-lópez, R., Palomares-rius, J. E., Wesemael, W. I. M. M. L., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14, 946–961.
- Kaloshian, I., & Teixeira, M. (2019). Advances in plant-nematode interactions with emphasis on the notorious nematode genus *Meloidogyne*. *Phytopathology*, 109, 1–9.

- Kaplan, F., Alborn, H. T., Reuss, S. H. Von, Ajredini, R., Ali, J. G., Akyazi, F., Stelinski, L. L., Edison, A. S., Schroeder, F. C., & Teal, P. E. (2012). Interspecific nematode signals regulate dispersal behavior. *PLoS ONE*, *7*, e38735.
- Keating, B. A., Carberry, P. S., Bindraban, P. S., Asseng, S., Meinke, H., & Dixon, J. (2010). Eco-efficient agriculture : concepts , challenges , and opportunities. *Crop Science*, *50*, 109–119.
- Lambert, K. N., Ferrie, B. J., Nombela, G., Brenner, E. D., & Williamson, V. M. (1999). Identification of genes whose transcripts accumulate rapidly in tomato after root-knot nematode infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *55*, 341–348.
- Landi, S., D’Errico, G., Roversi, P. F., & D’Errico, F. P. (2018). Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with different combinations of nematicides and a resistant rootstock: Preliminary data. *Redia*, *101*, 47–52.
- Macosko, E. Z., Pokala, N., Feinberg, E. H., Chalasani, S. H., Butcher, R. A., Clardy, J., & Bargmann, C. I. (2009). A hub-and-spoke circuit drives pheromone attraction and social behaviour in *C. elegans*. *Nature*, *458*, 1171–1175.
- Malézieux, E., Crozat, Y., Dupraz, C., Laurans, M., Makowski, D., Ozier-Lafontaine, H., Rapidel, B., de Tourdonnet, S., & Valantin-Morison, M. (2009). Mixing Plant Species in Cropping Systems: Concepts, Tools and Models: A Review. *Agronomy for Sustainable Development*, *29*, 43–62.
- Manohar, M., Tenjo-Castano, F., Chen, S., Zhang, Y. K., Kumari, A., Williamson, V. M., Wang, X., Klessig, D. F., & Schroeder, F. C. (2020). Plant metabolism of nematode pheromones mediates plant-nematode interactions. *Nature Communications*, *11*, 1–11.
- Manosalva, P., Manohar, M., von Reuss, S. H., Chen, S., Koch, A., Kaplan, F., Choe, A., Micikas, R. J., Wang, X., Kogel, K., Sternberg, P. W., Williamson, V. M., Schroeder, F. C., & Klessig, D. F. (2015). Conserved nematode signalling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. *Nature Communications*, *6*, 7795.
- Martínez-Medina, A., Van Wees, S. C. M., & Pieterse, C. M. J. (2017). Airborne signals

- from *Trichoderma fungi* stimulate iron uptake responses in roots resulting in priming of jasmonic acid-dependent defences in shoots of *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum*. *Plant Cell and Environment*, *40*, 2691–2705.
- Melakeberhan, H., & Dey, J. (2003). Competition between *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita* or *Pratylenchus penetrans*: Independent Infection Rate Measurements. *Journal of Nematology*, *35*, 1–6.
- Mendy, B., Wang'ombe, M. W., Radakovic, Z. S., Holbein, J., Ilyas, M., Chopra, D., Holton, N., Zipfel, C., Grundler, F. M. W., & Siddique, S. (2017). *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinase NILR1 is required for induction of innate immunity to parasitic nematodes. *PLoS Pathogens*, *13*, 1–22.
- Milligan, S. B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P., & Williamson, V. M. (1998). The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *The Plant Cell*, *10*, 1307–1319.
- Mitchum, M. G., Hussey, R. S., Baum, T. J., Wang, X., Elling, A. A., Wubben, M., & Davis, E. L. (2013). Nematode effector proteins: An emerging paradigm of parasitism. *New Phytologist*, *199*, 879–894.
- Molinari, S., & Miacola, C. (1997). Interactions between resistant tomato cvs and *Meloidogyne* spp. in vitro. *Nematol. Medit.*, *25*, 63–71.
- Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D. L., Nijs, L. den, Hockland, S., Maafi, Z. T. (2011). Current nematode threats to world agriculture. In *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*, 21–43.
- Poulin, R., & Randhawa, H. S. (2013). Evolution of parasitism along convergent lines: from ecology to genomics. *Parasitology*, *142*, 1–10.
- Pungalija, C., Srinivasan, J., Fox, B. W., Malik, R. U., Ludewig, A. H., Sternberg, P. W., & Schroeder, F. C. (2009). A shortcut to identifying small molecule signals that regulate behavior and development in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*, 7708–7713.
- Putten, W. H. van der, Cook, R., Costa, S., Davies, K. G., Fargette, M., Freitas, H., Hol,

- W. H. G., Kerry, B. R., Maher, N., Mateille, T., Moens, M., Peña, E. de la, Piskiewicz, A., Raeymaekers, A., Echeverría, S. R., & Wurff, A. W. G. van der. (2006). Nematode interactions in nature: models for sustainable control of nematode pests of Crop plants? *Advances in Agronomy*, *89*, 227–260.
- Ratnadass, A., Fernandes, P., Avelino, J., & Habib, R. (2012). Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *32*, 273–303.
- Reynolds, H. W., Carter, W. W., & O'Bannon, J. H. (1970). Symptomless resistance of alfalfa to *Meloidogyne incognita* acrita. *Journal of Nematology*, *2*, 131–134.
- Rivard, C. L., & Louws, F. J. (2008). Grafting to Manage Soilborne Diseases in *Heirloom Tomato* Production. *HortScience*, *43*, 2104–2111.
- Robbins, C. T., Mole, S., Hagerman, A. E., & Hanley, T. A. (1987). Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in dry matter digestion? *Ecology*, *68*, 1606–1615.
- Rumbos, C. I., Khah, E. M., & Sabir, N. (2011). Response of local and commercial tomato cultivars and rootstocks to *Meloidogyne javanica* infestation infestation. *Australian Journal of Crop Science*, *11*, 1388–1395.
- Schoener, T. W. (1983). Field experiments on interspecific competition. *The American Naturalist*, *122*, 240–285.
- Seid, A., Fininsa, C., Mekete, T., Decraemer, W., & Wesemael, W. M. L. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) – a century-old battle. *Nematology*, *17*, 995–1009.
- Sereno, P. C., & Danchin, E. G. J. (2014). Parasitic success without sex – the nematode experience. *Journal of Evolutionaty Biology*, *27*, 1323–1333.
- Smant, G., Helder, J., & Goverse, A. (2018). Parallel adaptations and common host cell responses enabling feeding of obligate and facultative plant parasitic nematodes. *The Plant Journal*, *93*, 686–702.
- Sochová, I., Hofman, J., & Holoubek, I. (2007). Effects of seven organic pollutants on soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environment International*, *33*, 798–804.

- Sorribas, F. J., Ornat, C., Verdejo-lucas, S., Galeano, M., & Valero, J. (2005). Effectiveness and profitability of the *Mi*-resistant tomatoes to control root-knot nematodes. *European Journal of Plant Pathology*, *111*, 29–38.
- Srinivasan, J., Kaplan, F., Ajredini, R., Zachariah, C., Alborn, H. T., Teal, P. E. A., Malik, R. U., Edison, A. S., Sternberg, P. W., & Schroeder, F. C. (2008). A blend of small molecules regulates both mating and development in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *454*, 1115–1118.
- Srinivasan, J., von Reuss, S. H., Bose, N., Zaslaver, A., Mahanti, P., Ho, M. C., O'Doherty, O. G., Edison, A. S., Sternberg, P. W., & Schroeder, F. C. (2012). A modular library of small molecule signals regulates social behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biology*, *10*, e1001237.
- Talavera, M., Verdejo-Lucas, S., Ornat, C., Torres, J., Vela, M. D., Macias, F. J., Cortada, L., Arias, D. J., Valero, J., & Sorribas, F. J. (2009). Crop rotations with *Mi* gene resistant and susceptible tomato cultivars for management of root-knot nematodes in plastic houses. *Crop Protection*, *28*, 662–667.
- Thies, J. A., Davis, R. F., Mueller, J. D., Fery, R. L., Langston, D. B., & Miller, G. (2004). Double-cropping cucumbers and squash after resistant bell pepper for root-knot nematode management. *Plant Disease*, *88*, 589–593.
- Tilman, D., & Downing, J. A. (1994). Biodiversity and stability in grasslands. *Nature*, *367*, 363–365.
- Triantaphyllou, A. C. (1973). Environmental sex differentiation of nematodes in relation to pest management. *Annual Review Phytopathology*, *11*, 441–462.
- Trudgill, D. L., & Blok, V. C. (2001). Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *39*, 53–77.
- Umesh, K. C., Ferris, H., & Bayer, D. E. (1994). Competition between the plant-parasitic nematodes *Pratylenchus neglectus* and *Meloidogyne chitwoodi*. *Journal of Nematology*, *26*, 286–295.
- van den Hoogen, J., Geisen, S., Wall, D. H., Wardle, D. A., Traunspurger, W., de Goede,

- R. G. M., Adams, B. J., Ahmad, W., Ferris, H., Bardgett, R. D., Bonkowski, M., Campos-Herrera, R., Cares, J. E., Caruso, T., de Brito Caixeta, L., Chen, X., Costa, S. R., Creamer, R., da Cunha e Castro, J. M., Crowther, T. W. (2020). A global database of soil nematode abundance and functional group composition. *Scientific Data*, 7, 1–8.
- Venema, J. H., Dijk, B. E., Bax, J. M., Hasselt, P. R. van, & Elzenga, J. T. M. (2008). Grafting tomato (*Solanum lycopersicum*) onto the rootstock of a high-altitude accession of *Solanum habrochaites* improves suboptimal-temperature tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 63, 359–367.
- Verdejo-Lucas, S, Cortada, L., Sorribas, F. J., & Ornat, C. (2009). Selection of virulent populations of *Meloidogyne javanica* by repeated cultivation of *Mi* resistance gene tomato rootstocks under field conditions. *Plant Pathology*, 58, 990–998.
- Verdejo-Lucas, S, Talavera, M., & Andrés, M. F. (2012). Virulence response to the *Mi* . 1 gene of *Meloidogyne* populations from tomato in greenhouses. *Crop Protection*, 39, 97–105.
- Verdejo-Lucas, Soledad, Blanco, M., Cortada, L., & Sorribas, F. J. (2013). Resistance of tomato rootstocks to *Meloidogyne arenaria* and *Meloidogyne javanica* under intermittent elevated soil temperatures above 28 C. *Crop Protection*, 46, 57–62.
- Vieira dos Santos, M. C., Abrantes, I., & Curtis, R. H. C. (2017). Priming plant defence responses can enhance the biological control of *Pochonia chlamydosporia* against root-knot nematodes. In R. H. Manzanilla-López & L. V. Lopez-Llorca (Eds.), *Perspectives in Sustainable Nematode Management Through Pochonia chlamydosporia Applications for Root and Rhizosphere Health*, 295–308. Springer International Publishing.
- Vieira dos Santos, M. C., Curtis, R. H. C., & Abrantes, I. (2014). The combined use of *Pochonia chlamydosporia* and plant defence activators - a potential sustainable control strategy for *Meloidogyne chitwoodi*. *Phytopathologia Mediterranea*, 53, 66–74.
- Viljoen, J. J. F., Labuschagne, N., Fourie, H., & Sikora, R. A. (2019). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomatoes and carrots by plant

- growth-promoting rhizobacteria. *Tropical Plant Pathology*, *44*, 284–291.
- von Reuss, S. H., Bose, N., Srinivasan, J., Yim, J. J., Judkins, J. C., Sternberg, P. W., & Schroeder, F. C. (2012). Comparative metabolomics reveals biogenesis of ascarosides, a modular library of small-molecule signals in *C. elegans*. *Journal of the American Chemical Society*, *134*, 1817–1824.
- Wang, C., Lower, S., & Williamson, V. M. (2009). Application of Pluronic gel to the study of root- knot behaviour. *Nematology*, *11*, 453–464.
- Wesemael, W. M., & Moens, M. (2011). Screening of common bean ( *Phaseolus vulgaris* ) for resistance against temperate root-knot nematodes ( *Meloidogyne* spp .). *Pest Management Science*, *68*, 702–708.
- Williamson, V. M. (1998). Root-Knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annual Review Phytopathology*, *36*, 277–293.
- Wuyts, N., Swennen, R., & De Waele, D. (2006). Effects of plant phenylpropanoid pathway products and selected terpenoids and alkaloids on the behaviour of the plant-parasitic nematodes *Radopholus similis*, *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incognita*. *Nematology*, *8*, 89–101.
- Xu, J., Narabu, T., Mizukubo, T., & Hibi, T. (2001). A molecular marker correlated with selected virulence against the tomato resistance gene *Mi* in *Meloidogyne incognita* , *M . javanica* and *M . arenaria*. *Phytopathology*, *91*, 377–382.
- Yamada, K., Hirotsu, T., Matsuki, M., Butcher, R. A., Tomioka, M., Ishihara, T., Clardy, J., Kunitomo, H., & Iino, Y. (2010). Olfactory plasticity is regulated by pheromonal signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *329*, 1647–1650.
- Yang, Z., & Rannala, B. (2016). Species Identification by Bayesian Fingerprinting : A Powerful Alternative to DNA Barcoding. *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*, 1–13.
- Yu, Y., Zhang, Y. K., Manohar, M., Artyukhin, A. B., Kumari, A., Tenjo-Castano, F. J., Nguyen, H., Routray, P., Choe, A., Klessig, D. F., & Schroeder, F. C. (2021). Nematode signaling molecules are extensively metabolized by animals, plants, and microorganisms. *ACS Chemical Biology*, *16*, 1050–1058.

Zavaleta, E. M., & Gomez, O. R. (1995). Effect of *Tagetes erecta* L. tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) intercropping on some potato pests. *Fitopatologia*, 30, 35–46.