



Pesquisa de Nemátodes dos Géneros *Globodera* e *Meloidogyne* nas Principais Culturas Hortícolas em Ar Livre e Estufa nos Açores

Samuel Maiato de Andrade

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica
Hortofruticultura e Viticultura

Orientadores: Doutora Maria de Lurdes Inácio

Doutor Arlindo Lima

Júri:

Presidente: Doutor José Carlos Franco Santos Silva, Professor associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Helena Mendes da Costa Ferreira Correia de Oliveira, Professora associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Doutora Maria Lurdes Nunes Silva Inácio, Investigadora auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, orientadora.

Agradecimentos

Gostaria de expressar toda a minha gratidão aos meus pais, à minha irmã e toda a minha família pelo apoio, carinho e fé, sem eles não teria conseguido ultrapassar todos os obstáculos que tive durante esta etapa fulcral da minha vida.

Não poderia também deixar de agradecer imenso a perseverança e apoio dados pela minha namorada, Maria Martins, ela foi a grande responsável por não ter desistido, foi incansável.

Tive a sorte de ter a ajuda na Direção Regional de Agricultura de duas excelentes técnicas, a Eng^a Laura Cordeiro e a Eng^a Ana Catarina Durão, que me transmitiram muito conhecimento sobre nemátodes, desde os procedimentos de extração, até à identificação do género, vindo a consolidar tudo o que tinha aprendido na universidade e a estabelecer uma ponte entre a parte prática e teórica.

Também gostaria de deixar uma palavra de apreço a todos os restantes colaboradores da Direção Regional de Agricultura, mais precisamente do polo existente em Ponta Delgada, que me receberam de braços abertos desde o primeiro dia e sempre me deixaram à vontade para realizar as mais diversas tarefas.

Tenho também de agradecer todo o esforço e dedicação do meu orientador interno, Professor Arlindo Lima, que desde o início demonstrou todo o interesse em acompanhar a minha dissertação.

Não poderia deixar de expressar a minha gratidão à orientadora externa, Doutora Maria de Lurdes Inácio, que me aceitou no laboratório de Nematologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.) e me passou tanto conhecimento com toda a sua experiência e forma simples de explicar o que aparentava ser difícil.

A Eng^a Leidy Rusinque foi uma peça fundamental em todo este estudo, avançando muitas vezes na análise bioquímica uma vez que eu não podia estar sempre presente em Portugal Continental aquando da chegada das amostras ao INIAV, e também me orientou muitíssimo, tanto na componente teórica como na prática, sendo extremamente prestável.

A toda a equipa do laboratório de Nematologia do INIAV, o meu muito obrigado pela forma como encararam mais um projeto, mesmo já estando assoberbados de trabalho; nunca baixaram os braços quando precisei deles e foram sempre extraordinariamente profissionais e determinados na procura de resultados fidedignos.

Resumo

Os nemátodes fitoparasitas causam elevados prejuízos na atividade agrícola, principalmente quando a sua densidade populacional é elevada. É imprescindível proceder à sua identificação, com o intuito de implementar medidas de luta eficazes adaptadas a cada situação e visando a sustentabilidade dos sistemas de produção.

Os nemátodes pertencentes aos géneros *Meloidogyne* (nemátodes das galhas radiculares) e *Globodera* spp. (nemátodes de quisto) incluem espécies de grande impacto nas culturas que parasitam e algumas espécies são consideradas de quarentena.

Este estudo teve por objetivo identificar as espécies destes géneros e contribuir para o conhecimento da sua prevalência na ilha de São Miguel, procurando determinar quais as espécies que mais impacto estão a causar na horticultura dos Açores. Numa primeira fase foram recolhidas as amostras de várias parcelas e diversos municípios da ilha de São Miguel, procedendo-se depois à extração dos nemátodes, através do método de Fenwick no caso de *Globodera* spp., e com o método da flutuação centrífuga em solução hipersaturada de sacarose, para *Meloidogyne* spp. Após a extração, procedeu-se à deteção das formas móveis dos nemátodes do género *Meloidogyne*, e de fêmeas (quistos) de *Globodera* spp., e decorrente contabilização do número de indivíduos em cada amostra.

Em relação à pesquisa de *Globodera* spp., não se detetaram quistos em qualquer das amostras analisadas, permitindo concluir que estes nemátodes terão uma distribuição muito restrita na ilha.

No caso de *Meloidogyne* spp., os nemátodes detetados seguiram para biotestes visando infetar raízes de tomateiro e obter material biológico para análise bioquímica e identificação da espécie. Deste estudo resultou a primeira deteção no país das espécies *M. incognita* em brócolos, ervilha, acelga, pepino e curgete; de *M. arenaria* em feijão verde e couve repolho; e de *M. javanica* em espinafres, contribuindo com conhecimento relevante para a distribuição dos nemátodes das galhas radiculares em Portugal e na Europa.

Palavras-Chave: nemátodes das galhas, nemátodes de quisto, nemátodes fitoparasitas, Ilha de S. Miguel.

Abstract

Plant parasitic nematodes cause high losses in agriculture worldwide, especially when their population density is high. To implement effective control measures adapted to each situation and aiming at the sustainability of production systems, an accurate species identification is essential.

Nematodes belonging to the genera *Meloidogyne* (root-knot nematodes) and *Globodera* (cyst nematodes) include species with high impact on the crops they parasitize, and some species are included in the quarantine lists.

This study aimed to identify the species of both genera and contribute to the knowledge of their prevalence in São Miguel Island, as well as to determine the species that are causing the greatest damage to horticultural crops in the Azores. As a first step, samples were collected from several areas and several municipalities on São Miguel Island, followed by the extraction of the nematodes, using the Fenwick method in the case of *Globodera* sp., and through the centrifugal flotation method in a hyper-saturated solution of sucrose, for *Meloidogyne* sp. After extraction, suspensions were observed and the motile forms of *Meloidogyne* sp. and females (cysts) of *Globodera* sp. were counted in each sample.

Regarding *Globodera* sp., no cysts were detected in any of the analysed samples, leading to the conclusion that these nematodes will have a very restricted distribution on the island.

In the case of *Meloidogyne* spp., the remaining soil of positive samples was used to perform biotests on tomato roots to obtain biological material for biochemical analyses and identification of the species. On the scope of this study it was detected for the first time the species *M. incognita* parasitising broccoli, peas, chard, cucumber and courgette; *M. arenaria* parasitising green beans and cabbage; and *M. javanica* infecting spinach, contributing with relevant knowledge for the distribution of root-knot nematodes in Portugal and Europe.

Keywords: root-knot nematodes, cyst nematodes, plant parasitic nematodes, São Miguel Island.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Nemátodes dos Géneros <i>Globodera</i> e <i>Meloidogyne</i>	1
1.1.2 Classificação taxonómica	5
1.1.3 Biologia	5
1.1.4 Identificação.....	9
1.1.5 Sintomas nas plantas	17
1.1.6 Dispersão.....	19
1.1.7 Meios de proteção	20
1.2. Objetivos do Trabalho.....	22
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
2.1. Colheita de amostras.....	23
2.2. Extração de nemátodes.....	24
2.2.1 Extração de juvenis do género <i>Meloidogyne</i> spp.....	24
2.2.2 Extração de quistos do género <i>Globodera</i> spp.	25
2.3 Identificação morfológica	26
2.4 Bioteste com <i>Meloidogyne</i> spp.	27
III. ANÁLISE BIOQUÍMICA DE <i>MELOIDOGYNE</i> SPP.	29
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 Identificação Morfológica	32
4.2 Biotestes com <i>Meloidogyne</i> sp.	39
4.3 Análise Bioquímica	42
V. CONCLUSÃO.....	47
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
VII. ANEXOS.....	59
Anexo 1	59
Anexo 2.....	60
Anexo 3.....	62
Anexo 4.....	63
Anexo 5.....	65

Índice de Quadros

Quadro 1 - Taxonomia dos nemátodes dos géneros <i>Meloidogyne</i> e <i>Globodera</i> (HODDA, 2022)	5
Quadro 2 - Preparação de gel de poliacrilamida	30
Quadro 3 - Detecção de <i>Meloidogyne</i> sp. em amostras de 400 gramas, de solos hortícolas do município de Vila Franca	33
Quadro 4 - Detecção de <i>Meloidogyne</i> sp. em amostras de 400 gramas, de solos hortícolas do município de Nordeste	34
Quadro 5 - Detecção de <i>Meloidogyne</i> sp. em amostras de 400 gramas, de solos hortícolas do município de Ponta Delgada	35
Quadro 6 - Detecção de <i>Meloidogyne</i> sp. em amostras de 400 gramas, de solos hortícolas do município de Ribeira Grande.....	35
Quadro 7 - Detecção de <i>Meloidogyne</i> sp. em amostras de 400 gramas, de solos hortícolas do município de Lagoa	36
Quadro 8 - Detecção de <i>Meloidogyne</i> sp. em amostras de 400 gramas, de solos hortícolas do município de Povoação	37
Quadro 9 - Resultado dos biotestes das amostras do município de Vila Franca	39
Quadro 10 - Resultado dos biotestes das amostras do município da Povoação	40
Quadro 11 - Resultado dos biotestes das amostras do município do Nordeste.....	40
Quadro 12 – Resumo dos resultados dos biotestes das amostras do município de Ponta Delgada	41
Quadro 13 - Resultado dos biotestes das amostras do município da Lagoa	41
Quadro 14 - Resumo dos resultados dos biotestes das amostras do município da Ribeira Grande	42
Quadro 15- Detecção de <i>Meloidogyne</i> spp. em amostras de 400 gramas, de solos hortícolas do município de Ponta Delgada (Quadro completo).....	59
Quadro 16 - Detecção de <i>Meloidogyne</i> spp. em amostras de 400 gramas, de solos hortícolas do município de Ribeira Grande (Quadro completo).....	60
Quadro 17 - Resultado dos Biotestes das amostras do município de Ponta Delgada	62
Quadro 18 - Resultado dos Biotestes das amostras do município da Ribeira Grande.....	63
Quadro 19 - Resultados da identificação das espécies de <i>Meloidogyne</i> das amostras com bioteste positivo	65

Índice de Figuras

Figura 1 - Sintomas causados pelos nemátodes das galhas radiculares (<i>Meloidogyne</i> spp.) em cenoura; raiz de batateira afetada pelos nemátodes de quisto da batateira (<i>Globodera</i> spp.) (da esquerda para a direita; fonte: Lab Nematologia INIAV).	1
Figura 2 - Região anterior de nemátode juvenil do género <i>Meloidogyne</i> ; estilete assinalado com seta e com os nódulos basais visíveis (x600) (Rusique et al., 2022).	3
Figura 3 - Hábitos de alimentação dos nemátodes endoparasitas, designadamente dos nemátodes das galhas radiculares e nemátodes de quisto (Vieira & Gleason, 2019).	3
Figura 4 - Fases do ciclo de vida dos nematodes do género <i>Globodera</i> : 1) quisto com ovos no seu interior; 2) rompimento do quisto; 3) ovo com juvenil; 4) eclosão de J2 do ovo; 5) juvenil J2 infeccioso (fonte: Lab. Nematologia INIAV).	6
Figura 5 - Ciclo de vida dos nemátodes do género <i>Globodera</i> (fonte: Iowa State University).	7
Figura 6 - Esquema de parte do ciclo de vida do nemátode das galhas radiculares, desde a invasão da planta até à produção da massa de ovos (fonte: Bartlem et al., 2014).	9
Figura 7 - Quistos de <i>Globodera pallida</i> e <i>Globodera rostochiensis</i> (esquerda para a direita) (fonte SASA, 2016 e Alliance Globodera, respetivamente).	11
Figura 8 - Estiletos das fêmeas das espécies <i>Meloidogyne javanica</i> , <i>M. incognita</i> e <i>M. arenaria</i> , com os bolbos basais bem evidentes (da esquerda para a direita) (fonte: Eisenback, 1985).	12
Figura 9 - Parâmetros do padrão perineal das fêmeas de nemátodes das galhas-radiculares (<i>Meloidogyne</i> sp.) (fonte: Karssen & Moens, 2006).	13
Figura 10 - Parâmetros do padrão perineal das fêmeas de nemátodes das galhas-radiculares (<i>Meloidogyne</i> sp.) (fonte: Karssen et al., 2006).	13
Figura 11 - Região anterior dos machos das espécies <i>Meloidogyne javanica</i> , <i>M. incognita</i> e <i>M. arenaria</i> (fonte: Hunt & Handoo, 2009).	14
Figura 12 - Região anterior de juvenis do segundo estágio das espécies <i>Meloidogyne javanica</i> , <i>M. incognita</i> e <i>M. arenaria</i> (fonte: Eisenback, 1985).	14
Figura 13 - Perfil fenotípico da enzima esterase das principais espécies de <i>Meloidogyne</i> descritas no Brasil (fonte: Carneiro et al., 2017).	16
Figura 14 - Galhas em cenoura afetada por <i>Meloidogyne</i> sp. (fonte: Lab Nematologia INIAV).	18
Figura 15 - Mapa da Ilha de São Miguel com os locais de colheita de amostras para análise nematológica, estando os concelhos identificados com marcadores de diferentes cores (fonte: Google Maps).	23

Figura 16 - Centrifugadora Hettich, Universal 320 utilizada no método de extração de formas móveis de nemátodes pelo método da flutuação centrífuga (fonte: DRA).	24
Figura 17 - Levigador de Fenwick, para extração de nemátodes de quisto (fonte: DRA).	25
Figura 18 - Placas de contagem e microscópios para observação e identificação de nemátodes (fonte: DRA).....	26
Figura 19 - Placa de Petri com amostra de solo e lupa binocular para observação e deteção de quistos de <i>Globodera</i> spp. (fonte: DRA).	27
Figura 20 - Estufa de vidro, destinada aos biotestes com <i>Meloidogyne</i> spp., da Direção Regional de Agricultura (fonte: DRA).	28
Figura 21 - Raízes de tomateiro com presença de galhas radiculares.	28
Figura 22 – Placas de Petri contendo raízes de tomateiro plantado em solo infestado por <i>Meloidogyne</i> spp. recolhido de parcelas com espinafre, com cebola ou batata, que desenvolveram galhas, a ser enviadas para análise bioquímica (INIAV); em cada placa identifica-se o n.º da amostra, a cultura que existia no solo, <i>in situ</i> , e o nome do coletor.	29
Figura 23 - Cassete de gel, Mini-Protean II para a realização de eletroforese para estudo do padrão das esterases de <i>Meloidogyne</i> sp. (fonte: Lab. Bioquímica e Biologia Molecular INIAV).	30
Figura 24 - Etapas da eletroforese específica para a identificação de nemátodes com gel de poliacrilamida (fonte: Steward, 2022).....	31
Figura 25 - Observação ao microscópio de juvenis de segundo estágio do género <i>Meloidogyne</i> . Juvenil: (a) região anterior; (b) região da cauda, (c) nemátode completo (bar = 20 µm) (fonte: Rusinque et al., 2022).....	32
Figura 26 - Número médio de nemátodes juvenis (J2) (por 400 g de solo) do género <i>Meloidogyne</i> em cada um dos municípios em estudo.....	38
Figura 27 - Número de nemátodes juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne</i> sp. (em 400 g de solo), por cultura.	39
Figura 28 - Fenótipos das esterases de homogenatos de proteínas dos ovos das fêmeas das espécies <i>Meloidogyne arenaria</i> , <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i> e respetivas ilustrações de referência (fonte: Lab Nematologia INIAV).....	43
Figura 29 - Municípios onde foram identificadas as espécies de <i>Meloidogyne</i> na Ilha de São Miguel, Açores (Rusinque et al., 2022).....	45
Figura 30 - Síntese de resultados da identificação bioquímica (perfil das esterases) de <i>Meloidogyne</i> spp.	46

I. Introdução

1.1 Nemátodes dos Géneros *Globodera* e *Meloidogyne*

Os nemátodes são os animais mais numerosos do planeta (quatro em cada cinco animais) e ocupam os mais diversos habitats (Lorenzen, 1994; Bardgett & van der Putten, 2014). Os nemátodes que parasitam as plantas são uma grave ameaça para as culturas agrícolas e a floresta em termos mundiais (Ali et al., 2017), estimando-se um total de 4300 espécies fitoparasitas (Decraemer & Hunt, 2006). Destes, espécies dos géneros *Meloidogyne* (nemátodes das galhas radiculares) e *Globodera* (nemátodes de quisto) assumem particular relevância pelos danos que causam e pelas culturas de grande importância que afetam (Figura 1).



Figura 1 - Sintomas causados pelos nemátodes das galhas radiculares (*Meloidogyne* spp.) em cenoura; raiz de batateira afetada pelos nemátodes de quisto da batateira (*Globodera* spp.) (da esquerda para a direita; fonte: Lab Nematologia INIAV).

Os nemátodes dos géneros *Meloidogyne* e *Globodera* estão posicionados no *ranking* mundial de nemátodes com maior potencial de destruição das culturas, no primeiro e segundo lugar, sendo que o género *Meloidogyne* inclui mais de 100 espécies e tem mais de 3000 espécies de plantas hospedeiras, tendo o género *Globodera* um menor número de culturas hospedeiras (Perry et al., 2009).

As espécies *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*, habitam predominantemente em climas sub-tropicais e tropicais, formando um grupo de nemátodes das galhas radiculares designado de “tropical”, podendo também ser encontradas em climas temperados (Janssen et al., 2016).

No caso de *Meloidogyne* spp., em Portugal já foram detetadas as espécies *M. arenaria* (Neal, 1889, Chitwood, 1949); *M. chitwoodi* (Golden et al., 1980); *M. enterolobii* (Yang & Eisenback, 1983); *M. hapla* (Chitwood, 1949); *M. hispanica* (Hirschmann, 1986); *M.*

incognita (Kofoid & White, 1919, Chitwood, 1949); *M. javanica* (Treub, 1885, Chitwood, 1949); *M. luci* (Carneiro et al., 2014); *M. lusitanica* (Abrantes & Santos, 1991); *M. naasi* (Franklin, 1965), sendo as mais prevalentes *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* e *M. javanica* (Rusique et al., 2022).

A primeira identificação de indivíduos do género *Meloidogyne* em território português ocorreu nos Açores, em 1956, tendo sido identificada a espécie *M. javanica* na cultura do tomate (Inácio et al., 2018). Mais tarde, Rusique et al. (2021) detetaram *M. luci* associada à cultura da batata.

Analisando os relatórios de atividades anuais da Direção Regional da Agricultura, verifica-se que o género *Meloidogyne* continua muito presente na horticultura açoriana (Secretaria Regional da Agricultura e do Desenvolvimento Rural, 2021). Todavia, como o laboratório não efetua identificação da espécie, não se consegue concluir qual ou quais as mais frequentes nos Açores.

Os nemátodes do género *Globodera* foram identificados pela primeira vez em Portugal em 1956, designadamente *G. rostochiensis*, em batateira (Macara, 1963). Estudos levados a cabo pelo laboratório de Nematologia do INIAV permitiram constatar que a espécie *G. pallida* tem maior prevalência e dispersão no país relativamente à espécie *G. rostochiensis* (Camacho, 2016). A região dos Açores era considerada zona isenta destas duas espécies (designadas no seu conjunto como nemátodes de quisto da batateira) através de um plano nacional de prospeção bastante intensivo implementado em 2010. Contudo, em 2018 foi detetada *G. rostochiensis* (Inácio et al., 2020) mas desde então este plano tem permitido prevenir a dispersão da espécie nos Açores.

Os nemátodes das galhas radiculares (*Meloidogyne* spp.) são os mais dispersos em termos mundiais, causando a redução da produtividade das plantas e da qualidade dos frutos e vegetais (J. T. Jones et al., 2013; Seid et al., 2015). Existem diversas espécies dentro do género, mas as que têm maior influência sobre a produção agrícola nas regiões temperadas são *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. incognita*, sendo por isso as espécies mais investigadas (Collange et al., 2011). Como todos os nemátodes fitoparasitas, estes possuem uma estrutura na cavidade oral designada estilete, que lhes permite perfurar as células vegetais e extrair o conteúdo celular (Mitchum et al., 2013), com dilatações na base (bolbos ou nódulos basais) (Figura 2).

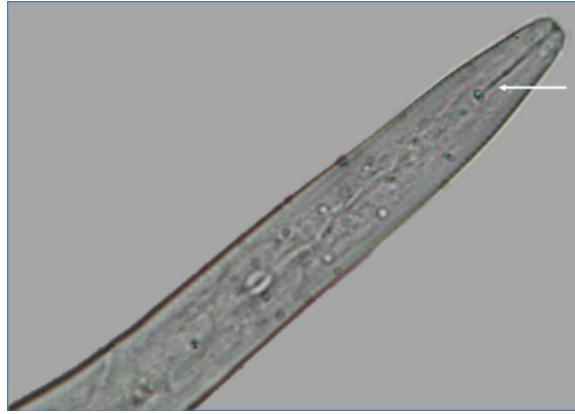


Figura 2 - Região anterior de nemátode juvenil do género *Meloidogyne*; estilete assinalado com seta e com os nódulos basais visíveis (x600) (Rusique et al., 2022).

O estilete move-se através de músculos, como uma agulha hipodérmica, estando interligado à faringe, que por sua vez está conectada com o intestino, seguindo-se o reto no caso das fêmeas e a cloaca nos machos (Singh & Phulera, 2015). Os nemátodes fitoparasitas têm uma grande diversidade de hospedeiros, e podem afetar diferentes órgãos das plantas, desde as raízes, caules ou mesmo folhas, sendo designados endoparasitas se passam pelo menos uma etapa do seu ciclo de vida dentro do tecido vegetal, ou ectoparasitas se nunca residem dentro do tecido vegetal. Tanto os nemátodes do género *Meloidogyne*, como *Globodera* sp. são endoparasitas, como se pode verificar na Figura 3 (Vieira & Gleason, 2019).

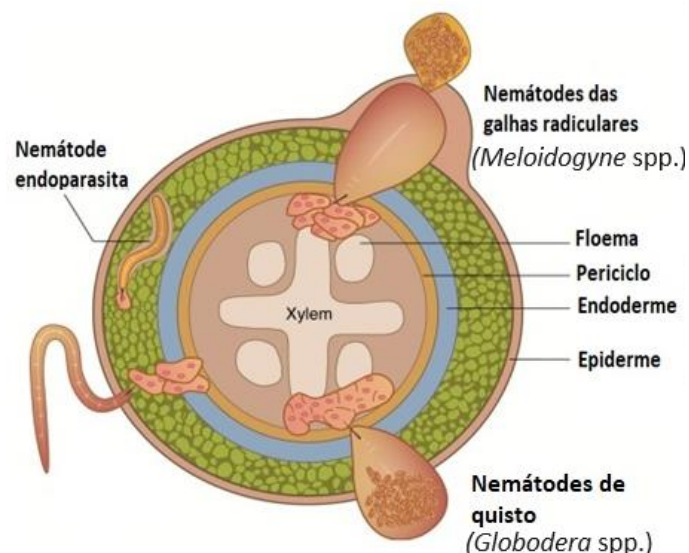


Figura 3 - Hábitos de alimentação dos nemátodes endoparasitas, designadamente dos nemátodes das galhas radiculares e nemátodes de quisto (Vieira & Gleason, 2019).

Os nemátodes *Meloidogyne* spp. e *Globodera* spp. têm maior prevalência em climas com temperaturas moderadas e humidades elevadas, sendo fulcral que exista uma película de água no solo para sobreviverem e existindo, por isso, em menores densidades populacionais quando ocorrem temperaturas muito elevadas (Song et al., 2016).

Os nemátodes deslocam-se primordialmente através da água, não tendo sistemas respiratório e circulatório, mas têm sistema digestivo, reprodutivo, muscular e um sistema excretor muito simples. Estes sistemas são fundamentais para as necessidades básicas de deslocação, alimentação e reprodução (Koppenhöfer et al., 2007). Estes animais não têm esqueleto interno, ou seja, a camada exterior (cutícula) atua contra a pressão do conteúdo interno para manter a forma do corpo e facilitar a sua locomoção (Mitkowski & Abawi, 2003).

No que respeita aos meios de proteção contra nemátodes fitoparasitas, podem ser empregues diferentes meios. De salientar que os meios de luta química são de utilização cada vez mais restrita pois as substâncias ativas mais eficazes foram retiradas do mercado, por serem muito nocivas para o ambiente e para o Homem (Oka et al., 2007). Como nem todos os meios de proteção têm a mesma eficácia no controlo de diferentes espécies de nemátodes, é fulcral efetuar uma identificação precisa, utilizando métodos de identificação rigorosos aconselhados pela EPPO (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*) e pelos especialistas mundiais.

Relativamente à identificação no género *Meloidogyne*, é aconselhado que a extração seja efetuada com o método de centrifugação em solução hipersaturada de sacarose e a identificação deve ser realizada recorrendo a um conjunto de métodos: morfológicos, morfométricos, bioquímicos e moleculares (EPPO, 2016).

No caso dos nemátodes do género *Globodera*, é impreterível a utilização do método de extração de Fenwick e a identificação deve basear-se na morfológica, complementada com a identificação molecular através de PCR Multiplex (EPPO, 2022).

É ainda determinante efetuar a identificação exata destes nemátodes devido ao facto de que se detetada alguma das espécies de quarentena, *Globodera pallida* e *G. rostochiensis*, *Meloidogyne fallax*, *M. chitwoodi*, *M. enterolobii* ou *M. mali*, as parcelas ficarão sujeitas a medidas de quarentena muito restritivas, impostas pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) e também emanadas pela União Europeia (EPPO, 2022).

1.1.2 Classificação taxonômica

A classificação taxonômica dos nemátodes dos gêneros *Meloidogyne* e *Globodera*, de acordo com (HODDA, 2022), está descrita no Quadro 1.

Quadro 1 - Taxonomia dos nemátodes dos gêneros *Meloidogyne* e *Globodera* (HODDA, 2022)

<i>Meloidogyne sp.</i>	
Reino	Animalia
Filo	Nematoda
Classe	Chromadorea
Subclasse	Chromadoria
Ordem	Panagrolaimida
Superfamília	Tylenchoidea
Família	Meloidogynidae
Gênero	<i>Meloidogyne</i>
<i>Globodera sp.</i>	
Reino	Animalia
Filo	Nematoda
Classe	Chromadorea
Subclasse	Chromadoria
Ordem	Panagrolaimida
Superfamília	Tylenchoidea
Família	Heteroderidae
Gênero	<i>Globodera</i>

1.1.3 Biologia

Globodera spp.

A cultura da batateira é sem dúvida a principal hospedeira dos nemátodes de quisto da batateira, *G. rostochiensis* e *G. pallida*. Além dela, a cultura do tomateiro e da beringela também são afetadas, mas no geral praticamente todas as plantas da família das solanáceas são hospedeiras, incluindo algumas infestantes (Sullivan et al., 2007). Os nemátodes do gênero *Globodera* têm uma gama de plantas hospedeiras muito mais restrita do que a dos nemátodes das galhas radiculares, sendo a rotação de culturas mais eficaz (Lilley et al., 2005).

Os exsudados radiculares estimulam a quebra de dormência dos ovos, que se encontram dentro dos quistos. Os quistos são as fêmeas grávidas que albergam os ovos no seu interior e constituem uma estrutura de resistência; nesses ovos estão os juvenis de segundo estágio (J2) (Torto et al., 2018). Após saírem dos quistos, os nemátodes

são atraídos para as raízes pelo quimiotactismo positivo, acabando por penetrar nas células radiculares, comumente na zona da coifa, com a ajuda do estilete afiado e móvel e de enzimas libertadas na saliva, produzidas nas glândulas esofágicas subventrais e dorsal (Qin et al., 2004). No interior da raiz, vão permanecer no espaço intercelular do córtex, paralelamente ao cilindro central, procurando uma célula indiferenciada com a ajuda do seu estilete, pois esta célula não tem capacidade de produzir calose (camada de polissacárido que forma uma parede celular temporária, de proteção) (Sobczak & Golinowski, 2011).

Os nemátodes vão segregar enzimas via saliva para as células indiferenciadas, que provocam a degradação do vacúolo central, ocorrendo a dissolução da parede celular e a fusão dos protoplastos (Golinowski et al., 1996).

Os juvenis criam um microtúbulo, tendo este a função de filtrar e reduzir a pressão dos produtos sintetizados produzidos pelas células modificadas, prevenindo a sua destruição (Eves-van den Akker et al., 2015).

Os quistos podem permanecer intactos no solo por 30 anos, que os ovos continuarão a ter alguma viabilidade, dando início a um novo ciclo de vida apenas quando se verificam condições favoráveis à sua propagação, podendo dar origem de 7 a 10 gerações por ano (Camacho, 2016).

O ciclo de vida dos nemátodes do género *Globodera* inclui o estágio de ovo, passando por quatro estádios juvenis até chegar a adulto. Tem uma duração de sensivelmente 35 a 40 dias, podendo originar várias gerações por cada ano agrícola (Bairwa et al., 2021). O ciclo inicia-se com a saída dos nemátodes dos ovos englobados no interior dos quistos, em estágio J2 (Figura 4), sendo esta fase estimulada pelos exsudados radiculares de plantas da família das solanáceas (Winner & Dinh, 2021). Já com formato vermiforme, estes vão encontrar as raízes através de quimioatração e penetram-nas sobretudo nas zonas intercelulares, desde o córtex (Devine & Jones, 2003).

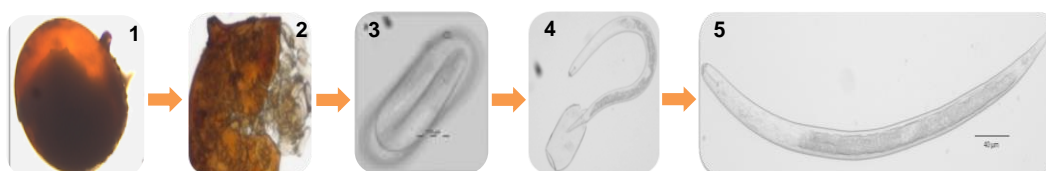


Figura 4 - Fases do ciclo de vida dos nemátodes do género *Globodera*: 1) quisto com ovos no seu interior; 2) rompimento do quisto; 3) ovo com juvenil; 4) eclosão de J2 do ovo; 5) juvenil J2 infecioso (fonte: Lab. Nematologia INIAV).

Já dentro da raiz, os nemátodes movem-se até se fixarem num local de alimentação, e os juvenis do estágio J2 transformam-se em indivíduos sedentários, até ao fim da sua vida útil no caso das fêmeas, e apenas até ao estágio adulto nos machos (Sobczak &

Golinowski, 2011) (Figura 5). Os juvenis do estágio J2 transformam-se em J3 e J4, e depois para o estado adulto, onde ocorre a diferenciação sexual, não sendo o género do nemátode definido geneticamente, mas sim pela disponibilidade de alimento no meio envolvente, quanto menos alimento maior formação de machos (Wainer & Dinh, 2021). As fêmeas vão aumentar de tal maneira de volume que irão romper o córtex e ficar com a parte posterior do seu corpo exposta na superfície da raiz (Price et al., 2021). Iniciam, então, a libertação de feromonas sexuais atraindo os machos, pois a reprodução é sexuada no género *Globodera* (Riga et al., 1996).

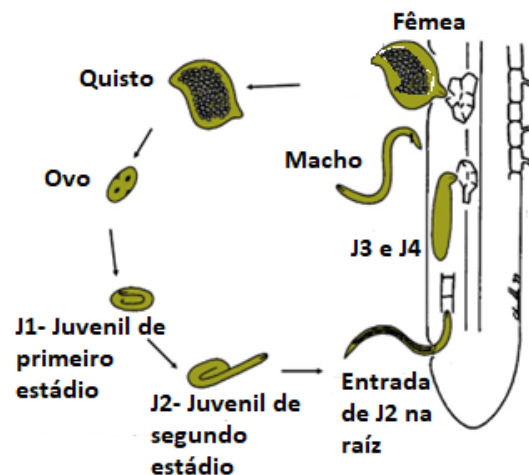


Figura 5 - Ciclo de vida dos nemátodes do género *Globodera* (fonte: Iowa State University).

As fêmeas, sedentárias, dão origem aos ovos e os machos vão sair das raízes e proceder à sua fecundação. Após este encontro ocorre a dessecação das fêmeas globosas, originando os quistos (Cotton et al., 2014). Numa fase inicial, os quistos diferem na coloração entre as duas espécies: em *G. rostochiensis*, o quisto começa por ter cor branco-pérola e progride para amarelo-dourado e por fim castanho-escuro, enquanto que em *G. pallida* os quistos são inicialmente de cor branco-pérola e depois passam diretamente a castanho-escuro (EPPO, 2022).

***Meloidogyne* spp.**

Os nemátodes do género *Meloidogyne* parasitam mais de 3000 espécies de plantas, estando incluídos vegetais, flores, gramíneas, arbustos, infestantes e árvores. Em Portugal, as espécies de culturas hortícolas mais atingidas são a batata, o tomate e a cenoura, em que as perdas causadas por nemátodes podem atingir 75%, entre muitas outras culturas hortícolas (Rusique et al., 2023). Além disso, podem ser hospedeiras

destes nemátodes algumas espécies de infestantes (Inácio et al., 2018). Esta elevada polifagia permite-lhes uma mais rápida adaptação a novos ambientes, visto que os exsudados de diversas plantas poderão estimular a quebra de dormência dos ovos (Trudgill, 1997).

O estilete dos nemátodes *Meloidogyne* permite-lhes extrair alimento das células gigantes, sendo estas resultado de união e expansão de várias células através de processos de endomitoses e citocineses, formando-se geralmente 1 a 2 dias após a penetração do nemátode na raiz, e conduzindo ao aparecimento de galhas, como resposta da planta à sua presença. O tamanho das galhas está relacionado com a densidade populacional e a resiliência da espécie hospedeira (Escobar et al., 2015).

O metabolismo das células hipertrofiadas é mantido pelas secreções constantes de enzimas e pelo consumo dos conteúdos celulares levado a cabo pelo nemátode sedentário, sendo os fotoassimilados mobilizados do floema para as células especiais, fazendo com que a planta tenha menos fotoassimilados para o seu desenvolvimento (Favery et al., 2016).

Após atingirem o estado adulto, as fêmeas sedentárias das três principais espécies de *Meloidogyne* (*M. arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica*) não dependem dos machos para se reproduzir, pois a reprodução é maioritariamente partenogénica, ocorrendo poliploidia e resultando na criação de indivíduos com genomas muito diferentes, devido a eventos de hibridação dos genes (Blanc-Mathieu et al., 2017). As fêmeas produzem massas de ovos segregando um saco gelatinoso através das suas seis glândulas retais e de seguida expulsam os ovos através da vulva para dentro deste saco, tendo esta a função de proteger os ovos de condições edafoclimáticas adversas (Subedi et al., 2020)

As galhas radiculares danificam os tecidos vasculares das raízes, interferindo assim com a normal circulação de nutrientes e de água; além disso diminuem a resistência das raízes ao ataque de bactérias e de fungos do solo (Rahman, 2003).

O ciclo de vida dos nemátodes do género *Meloidogyne* tem uma duração mínima de duas semanas, consoante as condições ambientais, como a disponibilidade de hospedeiro e a temperatura e humidade no solo, sendo a reprodução maioritariamente partenogénica (Mitkowski & Abawi, 2003).

Num primeiro estágio (J1) os nemátodes vão permanecer dentro da massa gelatinosa que envolve os ovos, tendo já o estilete desenvolvido, e irão passar para o estágio J2 (Saucet et al., 2016). Como J2, os nemátodes saem da massa de ovos à procura de plantas hospedeiras, atraídos pelos exsudados radiculares (Khalil, 2017). Ao encontrarem a planta, dão início à fase de invasão, penetrando nas raízes com a ajuda

do estilete e das enzimas degradativas, produzidas nas glândulas esofágicas (Wendimu, 2021). Estas enzimas vão degradar as paredes celulares, e os nemátodes entram na raiz, geralmente na zona da coifa, e de forma facilitada através de feridas (Chaudhary et al., 2019). De seguida, já no interior da raiz, vão induzir a transformação do tecido vascular indiferenciado num local de alimentação (Figura 6), provocando hipertrofia (aumento anormal do tamanho das células) e hiperplasia (multiplicação das células anormal); estes dois fenómenos dão origem às estruturas que designamos por galhas (Caillaud et al., 2008).

No interior da raiz, os nemátodes vão adquirir nutrientes, progredindo no seu ciclo de vida e passando por mais dois estádios juvenis (J3 e J4) (Warmerdam, 2019).

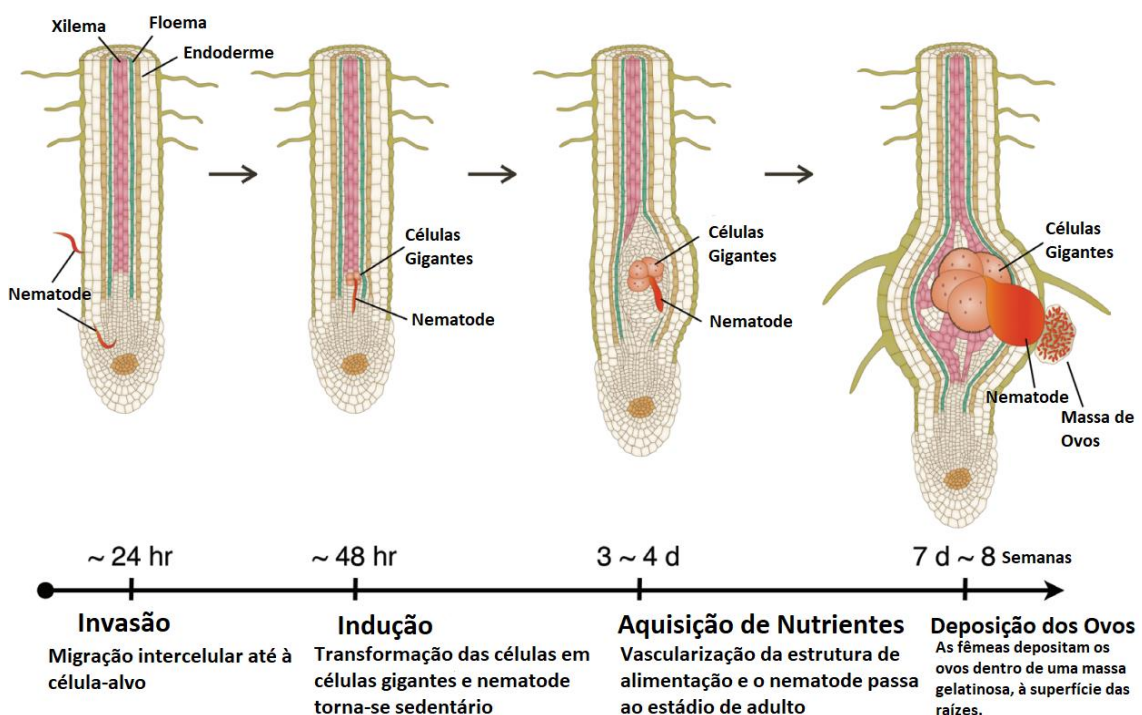


Figura 6 - Esquema de parte do ciclo de vida do nemátode das galhas radiculares, desde a invasão da planta até à produção da massa de ovos (fonte: Bartlem et al., 2014).

Na passagem de J4 para o estágio de adulto, verifica-se a diferenciação sexual, havendo a formação de um maior número de fêmeas do que de machos se houver alimento em abundância, e o contrário se o alimento for escasso (Castagnone-Sereno, 2006).

1.1.4 Identificação

Morfologia e morfometria

Antigamente, empregavam-se sobretudo as características morfológicas na identificação dos géneros e das espécies de nemátodes, utilizando-se: o padrão perineal

das fêmeas e as especificidades morfológicas e morfométricas dos machos (Figura 11) e dos juvenis J2 (Figura 12); depois avançou-se para a análise isoenzimática, sendo também utilizada a seletividade dos hospedeiros por parte dos nemátodes (Ye et al., 2019).

Com o passar dos anos, aumentou de forma exponencial o número de espécies identificadas, progredindo também as semelhanças nas características que antes eram boas diferenciadoras (Rusinque et al., 2018).

Além disso, a diversidade de famílias de plantas hospedeiras conhecidas por espécie de nemátode, aumentou, deixando de existir relações de simbiose específicas entre espécies de nemátodes e de plantas (Hesar et al., 2012).

***Globodera* spp.**

A peculiaridade morfológica que permite distinguir logo à partida os nemátodes do género *Globodera* da grande parte dos restantes, são os quistos, que se começam a formar após as fêmeas serem fecundadas. Estas vão sofrer uma transformação gradual no formato do seu corpo, passando de uma forma vermiforme para esférica devido aos ovos que se vão acumulando no seu interior (Wainer & Dinh, 2021).

Após a sua morte, a epiderme torna-se numa película de proteção para os ovos, adquirindo uma coloração final castanha nas duas principais espécies, *Globodera pallida* e *G. rostochiensis* (Wainer & Dinh, 2021). Esta cutícula é fundamental para o aumento da vida útil dos ovos armazenados no interior do quisto, que podem ficar viáveis por 20 a 30 anos. De notar que não se devem efetuar identificações apenas baseadas na morfologia dos quistos pois existem outros géneros que também formam quistos (Camacho, 2016).

Os quistos estão primeiramente presos aos tecidos superficiais das raízes, mas, mais tarde são libertados para o solo. Podem conter entre 50 a 1000 ovos e ter dimensões compreendidas entre 395-495 µm em *G. rostochiensis* e 468-600 µm em *G. pallida* (Rowe, 2022a).

Os indivíduos juvenis de *G. pallida* e *G. rostochiensis* são muito semelhantes, mas os juvenis de *G. pallida* são geralmente maiores, tendo um maior comprimento do corpo e estilete mais comprido e mais robusto, sendo os bolbos do estilete virados para à frente, ao contrário dos de *G. rostochiensis*, que têm bolbos mais pequenos e inclinados para trás (Rowe, 2022b).

As fêmeas do género *Globodera* rompem o córtex cerca de um mês a seis semanas após a invasão dos juvenis de segundo estágio (EPPO, 2022).

A parte posterior da fêmea é designada por bacia vulvar e está contida numa depressão arredondada; a fenda vulvar está rodeada por uma zona translúcida de cutícula fina que contém papilas (Rowe, 2022a, 2022b).

As principais diferenças morfológicas entre as duas espécies de nemátodes, *G. pallida* e *G. rostochiensis* são: i) a existência exclusiva de uma fase da fêmea de *G. rostochiensis* com coloração da epiderme amarelo-dourada (Figura 7), sendo esta fase em *G. pallida* branco-pérola; ii) o número de cristas cuticulares entre o ânus e o bordo da fenestra apresenta diferentes valores (Rowe, 2022a).



Figura 7 - Quistos de *Globodera pallida* e *Globodera rostochiensis* (esquerda para a direita) (fonte SASA, 2016 e Alliance Globodera, respetivamente).

***Meloidogyne* spp.**

Na distinção de espécies de *Meloidogyne* recorrendo-se à identificação morfológica, podem ser utilizados indivíduos de todos os estádios do ciclo de vida, mas são mais frequentemente analisadas as fêmeas por serem maiores e por estarem normalmente presentes em maior número (Hesar et al., 2012).

Desde 1940, quando Chitwood estabeleceu as características morfológicas e morfométricas diferenciadoras das quatro espécies de *Meloidogyne* identificadas até então, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. hapla* (Chitwood, 1949), era utilizada primordialmente a identificação morfológica. Entretanto, como começaram a aparecer novas espécies dentro do género, com características muito idênticas, ocorreram muitos erros e estes métodos deixaram de ser fiáveis, tendo de ser complementados com outras metodologias (Ye et al., 2019).

Fêmeas adultas

Segundo Eisenback (1985), alguns dos caracteres que menos diferem dentro da espécie no caso das fêmeas de *Meloidogyne* sp., são: o cone, o eixo, os bolbos e o comprimento do estilete, sendo por isso estas quatro características morfológicas

analisadas quando são encontradas fêmeas de *Meloidogyne* sp. e se pretende efetuar uma identificação com base na morfologia.

Para uma melhor identificação poderão ser efetuadas e analisadas as imagens da parte anterior destes indivíduos (Eisenback, 1985) (Figura 8).

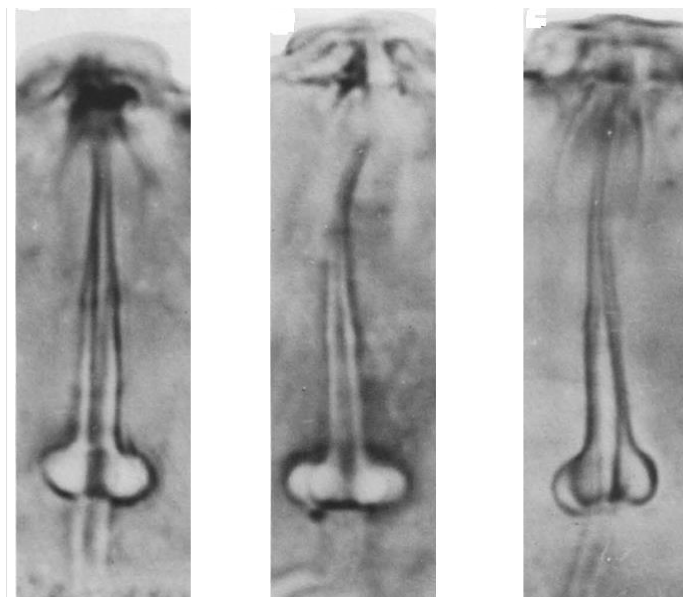


Figura 8 - Estiletes das fêmeas das espécies *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*, com os bolbos basais bem evidentes (da esquerda para a direita) (fonte: Eisenback, 1985).

No entanto, o parâmetro mais utilizado desde (Chitwood, 1949) é o padrão perineal das fêmeas (Figura 9): este é o método mais fiável, mas que viu aumentar a sua complexidade com o aparecimento de novas espécies. As características analisadas no padrão são: o arco dorsal, as linhas laterais, estrias dorsais e a zona terminal da cauda (Cunha et al., 2018). A identificação através do padrão perineal apenas pode ser efetuada em fêmeas, e por vezes, como ocorrem várias espécies de *Meloidogyne* na mesma amostra, torna-se muito moroso e complexo efetuar a identificação através deste método (Figura 10) (Naz et al., 2012).

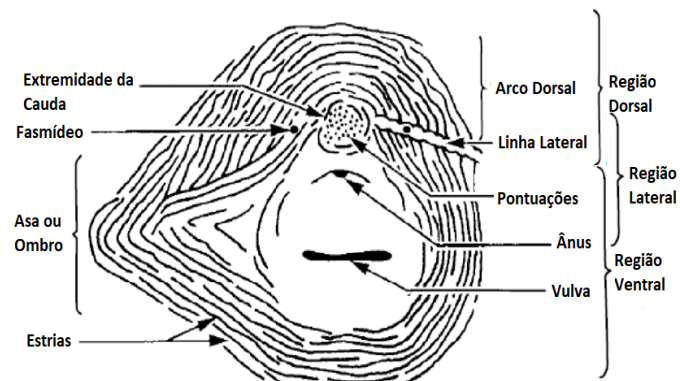


Figura 9 - Parâmetros do padrão perineal das fêmeas de nemátodes das galhas-radiculares (*Meloidogyne* sp.) (fonte: Karssen & Moens, 2006).

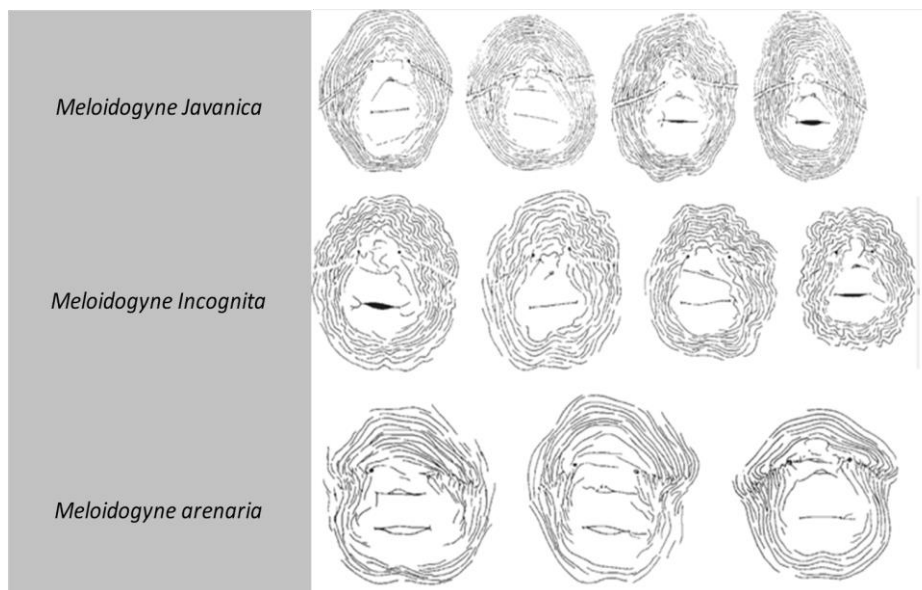


Figura 10 - Parâmetros do padrão perineal das fêmeas de nemátodes das galhas-radiculares (*Meloidogyne* sp.) (fonte: Karssen et al., 2006).

Machos

Os parâmetros dos machos e dos juvenis podem ser utilizados como complementares aos das fêmeas na identificação das espécies. A característica que permite desde logo identificar se estamos perante um indivíduo do género masculino é a espícula, órgão responsável pela cópula, sendo as características mais homogêneas: os lábios, a região da cabeça, o cone do estilete, o eixo e os bolbos basais (Rusinque, 2016) (Fig. 11). Também para os juvenis, são avaliadas estas características (Fig. 12).

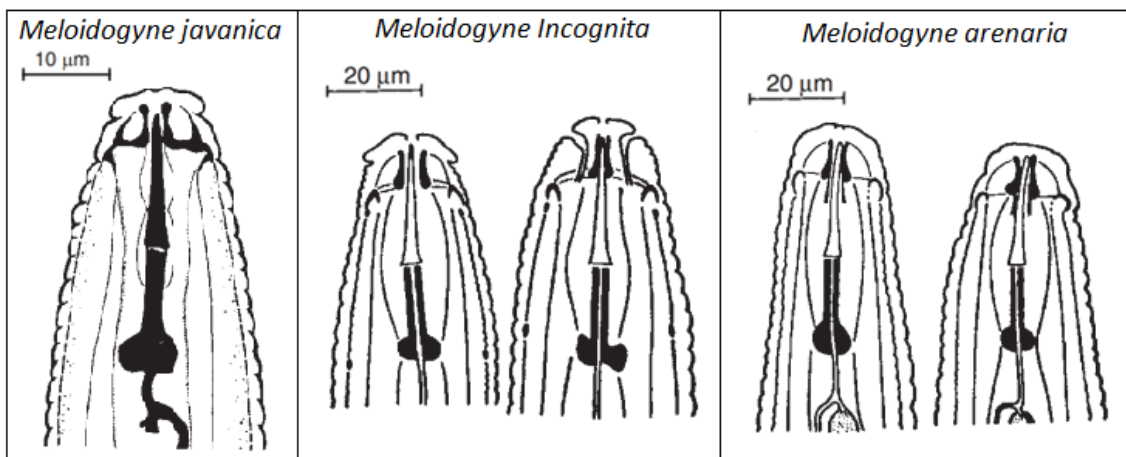


Figura 11 - Região anterior dos machos das espécies *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* (fonte: Hunt & Handoo, 2009).

Formas juvenis

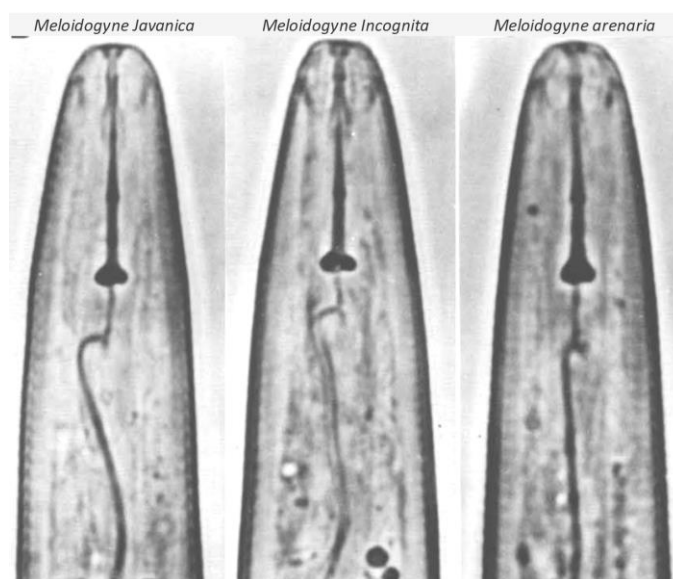


Figura 12 - Região anterior de juvenis do segundo estágio das espécies *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* (fonte: Eisenback, 1985).

Parâmetros Bioquímicos

A tradicional identificação de *Meloidogyne* spp. por via morfológica e morfométrica induz em erros, principalmente quando temos várias espécies do mesmo género na mesma amostra, mas também porque os parâmetros morfológicos e morfométricos podem ser muito semelhantes, devido a alterações genéticas relacionadas com o meio abiótico (Silva et al., 2014).

Para resolver estas incertezas na identificação de espécies do género *Meloidogyne*, começou a ser utilizada a eletroforese para estudo dos perfis isoenzimáticos das esterases ou da malato desidrogenase (Riascos et al., 2020). O primeiro cientista a comprovar que realmente existiam enzimas esterases capazes de diferenciar espécies de *Meloidogyne* foi Dickson et al. (1971).

A técnica bioquímica de diagnóstico das espécies de *Meloidogyne* baseada nos padrões das esterases foi elaborada por Esbenshade e Triantaphyllou (1990) tendo sido descobertos 16 padrões enzimáticos de diferentes espécies deste género, sendo os fenótipos mais utilizados nas três espécies mais comuns: o padrão J3 (*M. javanica*), os padrões I1 e I2 (*M. incognita*) e A2 e A3 (*M. arenaria*) (Esbenshade & Triantaphyllou, 1990). Assim, a identificação de espécies do género *Meloidogyne*, através dos fenótipos de isoenzimas, com a padronização individual das isoenzimas, através da eletroforese com gel de poliacrilamida, tem demonstrado ser bastante viável e replicável (Gorny et al., 2021). Mas esta técnica não é perfeita, pois não existem padrões enzimáticos para todas as espécies de *Meloidogyne* e só se pode efetuar a análise se forem encontradas fêmeas maduras (Blok & Powers, 2009).

O método de eletroforese em gel de poliacrilamida é usado para separar as proteínas ou outras macromoléculas através das cargas elétricas distintas contidas nas moléculas proteicas, utilizando para isso um campo elétrico (Roselino, 2008). A mobilidade das proteínas pelos poros que se formam no gel depende do seu tamanho molecular, carga elétrica dos aminoácidos e de pequenas variações na composição dos aminoácidos (Bogale et al., 2020). São utilizados dois géis, o de concentração e o de separação, tendo como principal diferença a concentração de acrilamida, que é menor no gel de concentração do que no de separação (Blok & Powers, 2009). O primeiro tem a função de limitar o decorrer da amostra de uma concavidade numa única coluna, enquanto o gel de separação, efetua a separação das proteínas por tamanho molecular (Yang & Mahmood, 2012).

A formação do gel provém da polimerização de duas substâncias a acrilamida e a metileno-bisacrilamida, sendo a polimerização catalisada pelo persulfato de amónio. Consoante a quantidade de acrilamida e de bisacrilamida, assim irá variar a porosidade do gel: quanto maior a concentração maior a porosidade (Morais et al., 2019).

O persulfato de amónio, por ser muito reativo deve ser a última substância a ser preparada e adicionada ao gel, sendo adicionada tetrametiletilenodiamina (TEMED), para ajudar na estabilização do persulfato de amónio; além deste deve-se também introduzir o tampão Tris com pH alcalino de 8.8, para alcalinizar a solução (Green & Sambrook, 2020).

A técnica da eletroforese para estudo das esterases é composta por várias etapas, ordenadas de seguinte forma: preparação da amostra, preparação dos géis, colocação da amostra e do *buffer*, eletroforese, coloração do gel e interpretação dos perfis fenotípicos (Grabski & Burgess, 2001). A interpretação do perfil fenotípico pode ser efetuada a olho nu, utilizando gel de acrilamida, sendo utilizado como corante o azul de bromofenol, ao contrário dos géis de agarose, cuja observação a olho nu é impossível (Steward, 2022).

As bandas são proteínas com corante, que formam as barras horizontais pretas, estando dispostas de acordo com o seu peso molecular, voltagem aplicada, tempo de eletroforese e concentração de acrilamida, de modo que cada banda represente um peso molecular diferente, tendo como termo de comparação de peso molecular, uma ou duas colunas, geralmente nas extremidades do gel, com um marcador proteico, que define uma escala de peso molecular (Gibbins, 2004), avaliando-se a mobilidade relativa (Rm). Quanto maior a espessura e densidade das bandas, maior a quantidade dessa proteína presente na amostra, sendo que várias bandas na mesma coluna indicam que estas amostras contêm várias proteínas com diferentes pesos moleculares (Blok & Powers, 2009).

A análise é realizada comparando os fenótipos obtidos com outros já referenciados para as espécies de *Meloidogyne* e com a referência *M. javanica* (Figura 13) (Rusinque, 2018).

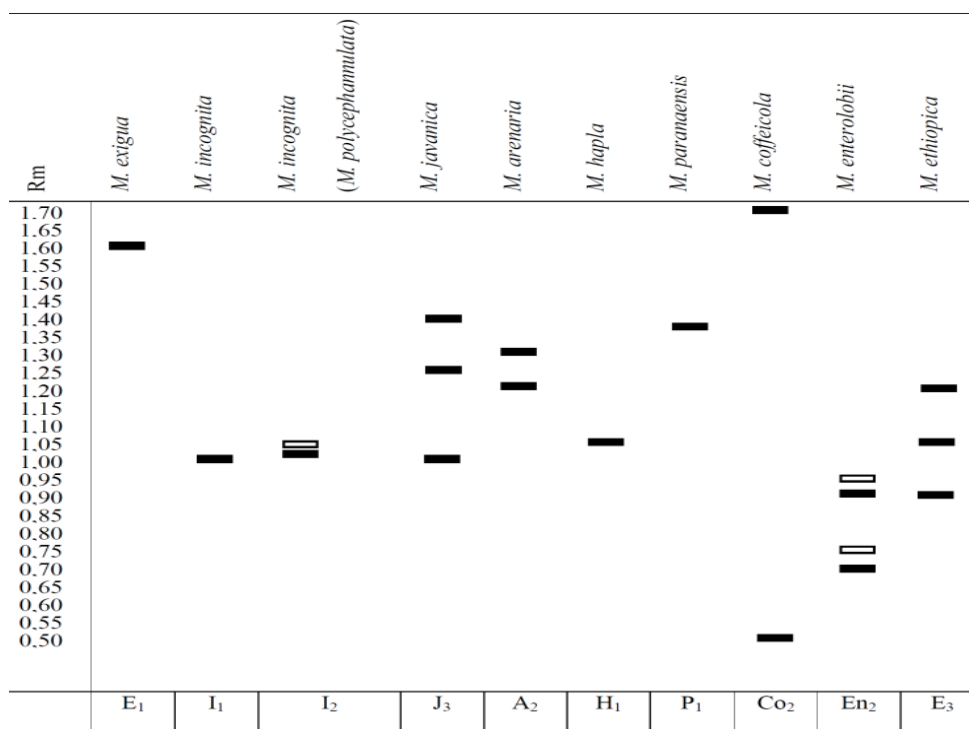


Figura 13 - Perfil fenotípico da enzima esterase das principais espécies de *Meloidogyne* descritas no Brasil (fonte: Carneiro et al., 2017).

Análise Molecular

Os métodos baseados na análise do DNA são em número considerável, baseando-se vários em impressões digitais e outros em nucleótidos. Dentro dos primeiros incluem-se: o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), o polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), a amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) e a utilização de marcadores específicos para cada espécie (Bogale et al., 2020).

A análise molecular de nemátodes das galhas radiculares progrediu apreciavelmente nos últimos 20 anos, tendo este método por base o polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), a sequenciação do DNA e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Em comparação com outros métodos de identificação, a identificação molecular é mais sensível, mais rápida, a espécie pode ser identificada em qualquer estágio e também diminui o erro humano inerente (Ye et al., 2019).

O gene *nad5*, pertencente ao grupo de genes mtDNA, está interligado com os padrões isoenzimáticos de esterase utilizados na análise bioquímica dos nemátodes das galhas radiculares, sendo este gene considerado um marcador bastante fiável para a identificação molecular de nemátodes das galhas radiculares (Phan et al., 2021).

1.1.5 Sintomas nas plantas

***Meloidogyne* spp.**

O sintoma mais específico do ataque dos nemátodes das galhas radiculares é o aparecimento de galhas nas raízes dos hospedeiros, que poderão não surgir em determinadas espécies de plantas (Perry et al., 2009). A resposta das plantas a uma infeção por nemátodes das galhas radiculares poderá ser diferente consoante o hospedeiro, a época da infeção e as condições culturais (Olsen, 2000).

As galhas limitam a absorção de água e de nutrientes e a translocação no sistema vascular, afetando não só a produtividade, mas também a qualidade da produção (Moens et al., 2009). Estas deformações são parecidas com os nódulos de fixação de azoto, que resultam da simbiose entre as plantas leguminosas e bactérias *Rhizobium*, e outras, mas são de simples distinção, uma vez que os nódulos são facilmente removíveis das raízes, ao contrário das galhas (Costa et al., 2021).

Sintomas na parte aérea (Hunt & Handoo, 2009):

- Deficiências nutricionais;
- Clorose das folhas;
- Murchidão anormal das folhas quando se verificam temperaturas elevadas associadas a stresse-hídrico;
- Folhas estagnam o crescimento, denotando menor tamanho do que é normal;
- Queda de frutos e de folhas anormal;
- Mortalidade em mancha.

Sintomas na parte radicular (Priya et al., 2011):

- Alongamento das raízes estagnado;
- Sistema radicular débil;
- Aparecimento de galhas (Figura 14)



Figura 14 - Galhas em cenoura afetada por *Meloidogyne* sp. (fonte: Lab Nematologia INIAV).

***Globodera* spp.**

É importante frisar que a resposta das plantas à infecção por nemátodes do género *Globodera* depende muito da densidade populacional e da capacidade que as variedades têm de resistir/tolerar os ataques dos nemátodes de quisto (Gartner et al., 2021).

Podemos tentar identificar a presença de nemátodes de quisto através da observação de certos sintomas aéreos ou radiculares, sendo os sintomas das raízes mais fiáveis,

nomeadamente o sinal mais específico deste género que é o aparecimento dos quistos (Perry et al., 2018).

Sintomas na parte aérea (C. E. C. Santos et al., 2010):

- Zonas de parcelas cultivadas com plantas mortas, em formato de mancha, praticamente circular e a coloração das folhas nessas zonas é esbranquiçada;
- Número anormal de folhas pequenas face ao estado fenológico;
- Nas horas de maior calor ocorre a murchidão das plantas mesmo que se proceda a uma rega;
- Redução do número de caules, dimensão dos folíolos e número de raízes;
- A planta tem menor resistência a outras doenças, havendo um desenvolvimento muito rápido e anormal dessas doenças ou pragas devido à elevada vulnerabilidade da planta a este endoparasita.

Sintomas na parte radicular (Camacho, 2016):

- Sistema radicular pouco desenvolvido;
- Raízes com lesões de coloração castanha e ramificação anormais, normalmente não ocorre resposta à fertilização;
- Os tubérculos são de reduzida dimensão, em menor número do que é habitual, e a epiderme poderá apresentar muitas deformações;

É fulcral entender que os sintomas atrás referidos não são específicos do ataque destes nemátodes de quisto, sendo muitas vezes confundidos com situações de stresses abiótico ou biótico, sendo a melhor e mais fácil identificação realizada através da visualização dos quistos nas raízes da planta (Orlando & Boa, 2023).

1.1.6 Dispersão

***Meloidogyne* spp.**

Os nemátodes do género *Meloidogyne*, por si só, percorrem distâncias curtas no solo de apenas meros metros por ano, sendo capazes de se mover apenas no segundo estágio juvenil e no estágio de adulto no caso dos machos (Lambert & Bekal, 2002). Os principais meios de dispersão são a água de rega, solo, substrato utilizado nas sementeiras, raízes ou plantas infetadas e transporte de solo agregado aos equipamentos agrícolas (Sikora et al., 2018).

***Globodera* spp.**

A dispersão dos nemátodes *Globodera* ocorre sobretudo por intermédio dos quistos, que são muito resistentes e transportáveis, nomeadamente através do calçado, das alfaias agrícolas, do solo infestado agregado aos tubérculos e das raízes das batateiras. As águas pluviais e de rega, assim como o vento, também podem ser importantes agentes de dispersão (Lambert & Bekal, 2002). Também, já foi comprovado que alguns animais ao ingerirem os quistos, estes vão ultrapassar o intestino mantendo-se intactos, e viáveis para eclodirem depois da sua expulsão, através dos excrementos, podendo também os animais servir de agentes de dispersão (Brodie, 1976).

1.1.7 Meios de proteção

***Meloidogyne* spp.**

A proteção quanto a nemátodes *Meloidogyne* spp. foi levada a efeito durante décadas com recurso à aplicação de nematocidas, fumigantes do solo, sendo a substância ativa mais utilizada o brometo de metilo (Back et al., 2018). Esta substância ativa demonstrou ser muito prejudicial para a biodiversidade da fauna presente no solo, para a saúde do ser humano e para o ambiente, e cada vez menos eficaz, pois estes nemátodes foram adquirindo resistência ao produto (Onkendi et al., 2014). Acresce que o brometo de metilo foi banido como pesticida da maioria dos países desenvolvidos, incluindo os da U.E. no âmbito do Regulamento N.º 1107/2009 (Sasanelli, 2021).

Os meios de proteção cultural têm mostrado bons resultados, sendo cada vez mais utilizados, designadamente através de:

- Aumento do teor de matéria orgânica no solo, pois assim aumenta o alimento disponível para as populações dos microrganismos benéficos presentes no solo: fungos, bactérias e nemátodes predadores (Inácio et al., 2018).
- Introdução de culturas não hospedeiras na rotação de culturas; é uma medida de controlo cada vez mais difícil de implementar, visto que as espécies de *Meloidogyne* têm vindo a aumentar a diversidade de hospedeiros que atacam (Grabau & Noling, 2019).
- Introdução de plantas da família *Brassicaceae* na rotação de culturas, procedendo depois à sua sideração, uma vez que a degradação dos tecidos vegetais vai dar origem a isotiocianatos, nitrilos, epitionitrilos e tiocianato, ocorrendo um efeito de biofumigação contra os nemátodes (Fourie et al., 2016).

- Os meios de proteção biológica, com a utilização de fungos, bactérias e nemátodes predadores têm sido considerados como a melhor alternativa aos meios químicos, principalmente rizobactérias, sendo utilizadas maioritariamente as espécies *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens* (Cetintas et al., 2018).
- Solarização do solo, embora não apresente, por vezes, a eficácia desejada, designadamente em climas temperados, pois não se fazem sentir temperaturas suficientemente elevadas para que a solarização surta o efeito que se pretende (Kokalis-Burelle et al., 2016).

***Globodera* spp.**

Globodera pallida e *G. rostochiensis* pertencem à lista de quarentena A2 da EPPO, ou seja, quando são detetados em parcelas, estas são colocadas em quarentena, podendo apenas entrar variedades de batata resistentes na rotação de cultura e culturas que não sejam hospedeiras (Camacho, 2016). Durante seis anos, não podem ser cultivadas variedades de batata suscetíveis, podendo este período ser reduzido a três anos se as entidades oficiais considerarem que todas os meios de proteção foram aplicados e a densidade populacional baixou para níveis praticamente nulos (EU Commission, 2022).

As medidas de proteção cultural a utilizar são: eliminar infestantes pois podem ser hospedeiras, adquirir batata de semente certificada, utilizar variedades resistentes, realizar rotação de culturas com plantas não hospedeiras, efetuar análises biológicas ao solo para proceder a uma deteção precoce e desinfetar as alfaias entre parcelas (Price et al., 2021).

Existe um vasto número de variedades resistentes a *G. pallida* (136 vars.) e a *G. rostochiensis* (983 vars.), tendo estas variedades um nível de resistência elevado (DGAV, 2023).

Além dos meios anteriormente referidos, os extratos de apiáceas e brássicas, podendo ser aplicados ou produzidos através da sideração de culturas destas famílias de hortícolas, têm efeito negativo sobre a eclosão dos nemátodes de quisto (Ochola et al., 2021).

1.2. Objetivos do Trabalho

Apesar de haver muitos trabalhos sobre a prevalência de diferentes espécies de nemátodes das galhas radiculares em culturas hortícolas em diferentes regiões do globo, estes estudos não têm sido realizados em Portugal, com carácter sistémico e abrangendo todo o território, em particular nas ilhas dos Açores.

Assim, com este trabalho pretendeu-se avaliar a presença de nemátodes das galhas, *Meloidogyne* spp., nas principais culturas hortícolas na ilha de S. Miguel, Açores, visando identificar as espécies aí presentes por forma a equacionar no futuro os meios de proteção mais adequados.

Paralelamente, e após a primeira deteção na ilha do nemátode *Globodera rostochiensis* (Inácio et al., 2020), também se pretendeu avaliar a incidência dos nemátodes de quisto da batateira com o intuito de estimar uma potencial dispersão ou, pelo contrário, confirmar S. Miguel como zona isenta destes fitoparasitas.

2.2. Extração de nemátodes

2.2.1 Extração de juvenis do género *Meloidogyne* spp.

Após a chegada das amostras ao laboratório, procedeu-se à extração de nemátodes de acordo com o método recomendado pela EPPO (2013), através do método de flutuação centrífuga em solução hipersaturada de sacarose, sendo este o método mais utilizado no INIAV. O procedimento foi o que se segue:

- de cada amostra de solo usaram-se cerca de 400 gramas;
- colocou-se o solo dentro do crivo de 180 µm, passando a amostra depois por outros dois crivos de 70 µm e 25 µm;
- adicionou-se água de forma gradual, para que o solo passasse para os crivos abaixo, até que todas as partículas ficassem retidas no crivo mais estreito;
- as partículas retidas foram colocadas em vários tubos Falcon de 0,2 mL cada;
- os tubos foram colocados na centrífuga por cerca de 4 minutos a 1750 rpm (Figura 16);
- o sobrenadante foi descartado com cuidado, deixando ficar o precipitado;
- adicionou-se sacarose à amostra, o quanto baste para perfazer o tubo;
- os tubos voltaram a ser colocados na centrífuga por cerca de 60 segundos a 1750 rpm;
- por fim, a amostra passou pelo crivo de 25 µm com o auxílio de água para não danificar os nemátodes;
- conservação da suspensão em frigorífico à temperatura aproximada de 5-6°C, até à sua observação.



Figura 16 - Centrífuga Hettich, Universal 320 utilizada no método de extração de formas móveis de nemátodes pelo método da flutuação centrífuga (fonte: DRA).

2.2.2 Extração de quistos do género *Globodera* spp.

Para a extração de quistos, utilizou-se o levigador de Fenwick (Figura 17) com a realização dos seguintes passos:

- a amostra foi introduzida no crivo do topo do levigador passando esta por uma malha de 1000 μm , para descartar inicialmente as partículas mais grosseiras;
- com o jato de água, induziu-se a separação de partículas por densidades no levigador, saindo pelo seu colar, após ascensão, apenas quistos e partículas minúsculas;
- à saída do levigador, foram colocados dois crivos sobrepostos, o primeiro com uma malha de 500 μm e o segundo de 150 μm , tendo por finalidade descartar ao máximo as partículas de solo e outros detritos sem interesse;
- por fim, as partículas retidas no crivo de 150 μm , foram colocadas num copo de vidro graduado e guardadas no frigorífico, à temperatura de 5-6°C por forma a preservar as características dos quistos por um maior período possível, uma vez que este processo foi moroso devido à falta de experiência.



Figura 17 - Levigador de Fenwick, para extração de nemátodes de quisto (fonte: DRA).

2.3 Identificação morfológica

Meloidogyne spp.

Antes de iniciar a observação ao microscópio foi necessário proceder à preparação da amostra, sendo primeiro retirado o excesso de água do copo com muito cuidado, visto que os nemátodes se concentram no fundo.

De seguida, com a ajuda de uma pipeta graduada, a amostra foi colocada em várias lâminas de contagem, para posterior observação ao microscópio (Leica MC190 HD, Wetzlar, Germany) com câmara fotográfica acoplada para a caracterização morfológica (Figura 18).



Figura 18 - Placas de contagem e microscópios para observação e identificação de nemátodes (fonte: DRA).

Globodera spp.

Cada uma das amostras dos recipientes de vidro foi transferida para uma placa de Petri. Os detritos foram deixados a sedimentar para que a amostra ficasse límpida, seguindo-se o processo de identificação com o auxílio de uma lupa binocular (Meiji techno emz-13) (Figura 19).

Com a ajuda de uma micro espátula, os detritos da amostra foram sendo gentilmente desviados, por forma a permitir uma boa observação.

Cada quisto detetado foi transferido com uma pinça de bicos finos para um pequeno vidro de relógio com uma lâmina de água, e observado de forma individual na mesma lupa, facilitando uma observação mais precisa e rigorosa sem detritos na amostra.



Figura 19 - Placa de Petri com amostra de solo e lupa binocular para observação e detecção de quistos de *Globodera* spp. (fonte: DRA).

2.4 Bioteste com *Meloidogyne* spp.

Ao detetar a presença de indivíduos do género *Meloidogyne* (formas móveis, J2), acionaram-se os procedimentos para a realização de biotestes, visando obter fêmeas no estágio adulto para a identificação bioquímica.

Antes mesmo da deteção de indivíduos do género *Meloidogyne* procedeu-se à sementeira de tomateiros, de uma variedade sem genes de resistência a *Meloidogyne* spp. O processo inicia-se com o preenchimento dos alvéolos de polietileno com substrato inerte, seguido de sementeira e passagem para a estufa, aí permanecendo aproximadamente 30 dias.

O bioteste começa com a colocação do remanescente da amostra de solo infestado num vaso de 1,5 L, seguida da plantação de tomateiros, previamente obtidos por sementeira direta, da variedade Coração-de-Boi (3 a 4 plantas por vaso para aumentar a probabilidade de infeção e para o caso de algumas das plantas morrerem) e colocação de uma etiqueta de identificação em cada amostra. É usada a variedade Coração-de-Boi pois é suscetível aos nemátodes das galhas radiculares. Os vasos foram mantidos numa estufa de vidro da DRA, com temperatura controlada (aproximadamente 25 °C), através de um sistema de ventilação e colocação adicional de uma rede de ensombramento, sendo regados diariamente (Figura 20). Ocorreram vários ataques de oídio durante o período de primavera-verão, tendo sido efetuadas algumas aplicações com o fungicida: Enxofre Bayer 80 WG, sendo este à base de enxofre. A eficácia dos tratamentos não foi a esperada e, como consequência, perderam-se algumas amostras por completo, tendo de se repetido todo o processo, quando havia ainda solo disponível dessa amostra.



Figura 20 - Estufa de vidro, destinada aos biotestes com *Meloidogyne* spp., da Direção Regional de Agricultura (fonte: DRA).

Decorridos 60 dias, as plantas foram desenraizadas com muito cuidado para não danificar as raízes, lavadas e observadas de forma muito meticulosa para a deteção de galhas radiculares (Figura 21).



Figura 21 - Raízes de tomateiro com presença de galhas radiculares.

Na presença de galhas, as raízes foram cuidadosamente acondicionadas em placas de Petri de poliestireno (Figura 22) para serem enviadas para o INIAV, para posterior análise bioquímica. Estas raízes foram envolvidas em papel de laboratório (Trapichel®) bem humedecido para preservar a humidade necessária à sobrevivência das fêmeas durante a viagem.



Figura 22 – Placas de Petri contendo raízes de tomateiro plantado em solo infestado por *Meloidogyne* spp. recolhido de parcelas com espinafre, com cebola ou batata, que desenvolveram galhas, a ser enviadas para análise bioquímica (INIAV); em cada placa identifica-se o n.º da amostra, a cultura que existia no solo, *in situ*, e o nome do coletor.

III. Análise bioquímica de *Meloidogyne* spp.

À chegada ao INIAV, as raízes de tomateiro com galhas foram observadas à lupa binocular (Nikon SMZ1500, Tokyo, Japan), sendo procuradas fêmeas em bom estado para análise bioquímica. Estas fêmeas foram colocadas, uma a uma, com a ajuda de uma pinça, em microtubos capilares de hematócrito contendo uma solução tampão com volume total de 5 μ L, sendo esta composta por 20% de sacarose v/v e 1% Triton X-100 v/v. De seguida, com a ajuda de uma agulha, as fêmeas foram esmagadas contra o fundo desses tubos, depois maceradas com um pilão e por fim guardadas nos microtubos a -20°C.

Para a realização da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), foi utilizado o aparelho Mini-Protean II, que permite proceder à eletroforese de duas cassetes de gel em simultâneo, poupando *buffer* e gel de separação de poliacrilamida a 7%.

Após a preparação das amostras, procedeu-se à limpeza dos vidros com água destilada e só depois à montagem das cassetes do gel com o auxílio de um suporte próprio para a colocação e solidificação do gel seguido pela elaboração do gel de poliacrilamida, sendo este constituído pelo gel de separação e gel de concentração (Quadro 2) (Figura 23).

Quadro 2 - Preparação de gel de poliacrilamida

Gel de Separação (7%)	
Substância	Quantidade
Acrilamida:Bis-acrilamida (36,5:1)	2,33 mL
Tris-HCl ¹ 1,0 M pH 8,8	3,75 mL
TEMED ²	50 µL
Água Destilada	Prefazer até 10 mL - 3,87 mL
APS ³ (Catalizador)	50 µL
Gel de Concentração (3%)	
Substância	Quantidade
Acrilamida:Bis-acrilamida (36,5:1)	0,666 mL
Tris-HCl ¹ 0,5 M pH 6,8	1,666 mL
TEMED ²	34 µL
Água Destilada	Prefazer até 5 mL - 2,60 mL
APS ³ (Catalizador)	34 µL
1-Tris de ácido clorídrico 2-TEMED- Catalizador da reação 3- Pesulfato de Amônio, peróxido iniciador	

Estando os vidros acondicionados, colocou-se primeiramente o gel de separação na ranhura com a ajuda de uma pipeta graduada.

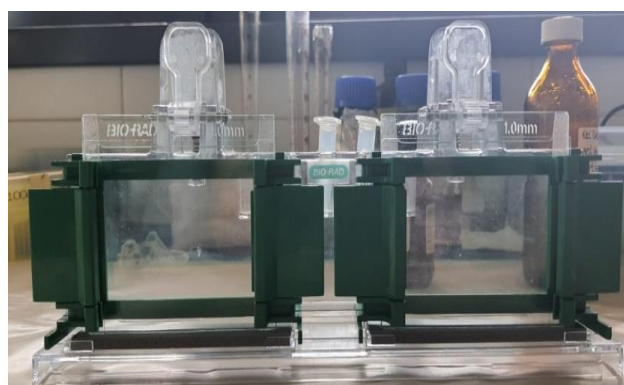


Figura 23 - Cassete de gel, Mini-Protean II para a realização de eletroforese para estudo do padrão das esterases de *Meloidogyne* sp. (fonte: Lab. Bioquímica e Biologia Molecular INIAV).

Depois de 60 minutos a repousar, a polimerização fica completa e o gel solidificado, retirando-se o pente, os encaixes e as molas e colocando as cassetes dentro de um pequeno recipiente retangular, onde é introduzida uma solução aquosa condutora de eletricidade (solução tampão) que vai permitir uma condução elétrica por todo o gel (Figura 24).

Para iniciar a separação das proteínas, colocou-se a tampa do recipiente e ligaram-se os elétrodos negativo e positivo, ajustando a corrente a 80 watts. O processo de separação demora cerca de 1 hora dependendo do tamanho médio das proteínas e da concentração de acrilamida no gel. Desligada a fonte de energia, as cassetes do reservatório foram retiradas e os vidros removidos com muito cuidado, um de cada vez, sendo o vidro mais pequeno o primeiro.

O gel extraído foi cortado e retirado o gel de concentração, e o gel de separação foi diretamente submerso numa solução com corante de acetato α -naftil, deixando repousar por aproximadamente 60 minutos. Depois, a solução corante foi escoada e o gel submerso em ácido acético para retirar o excesso do corante do gel de separação. O gel permaneceu de um dia para o outro no ácido, visando obter bandas mais nítidas.

No final, foi possível observar o aparecimento de várias colunas, com várias bandas na horizontal, sendo que cada coluna corresponde a uma amostra e as bandas mostram o tamanho molecular das proteínas contidas nessa amostra, de acordo com Esbenshade & Triantaphyllou, 1990. Os fenótipos padrão utilizados foram o J3 (*M. javanica*), os padrões I1 e I2 (*M. incognita*) e A2 e A3 (*M. arenaria*).

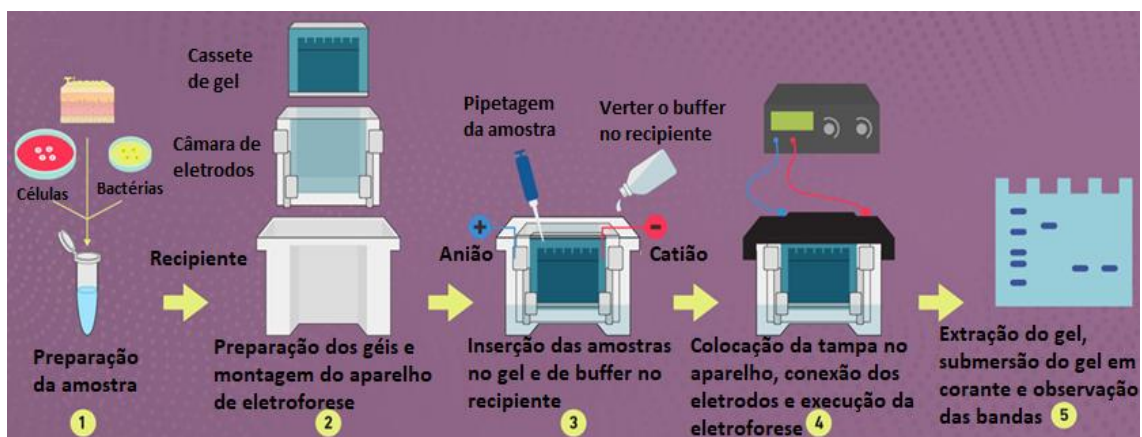


Figura 24 - Etapas da eletroforese específica para a identificação de nemátodes com gel de poliacrilamida (fonte: Steward, 2022).

IV. Resultados e Discussão

4.1 Identificação Morfológica

Os métodos de extração utilizados garantiram uma boa recuperação dos nemátodes, pois tanto o método de Fenwick como a flutuação centrífuga permitiram obter as suspensões de forma rápida e, no caso de *Meloidogyne* sp., comprovou-se uma baixa mortalidade associada ao procedimento.

A detecção de juvenis de segundo estágio (J2) do género *Meloidogyne* e de quistos de *Globodera* sp. apenas foi positiva no primeiro caso, ou seja, não foram encontrados quistos de *Globodera* spp. em qualquer das amostras analisadas. Em cada amostra, foram contabilizados os indivíduos J2 do género *Meloidogyne*, identificados de acordo com as características morfológicas, que se revelaram em tudo idênticas às descritas anteriormente para o género (Eisenback, 1985; Jepson, 1987).


Os juvenis J2 eram vermiformes, delgados e claramente anelados. A região da cabeça estava ligeiramente afastada do corpo. O estilete era delicado, estreito e pontiagudo, em relação aos bolbos estes eram pequenos e ovais. O poro excretor era saliente. A cauda tinha formato cónico com a ponta arredondada e zona terminal da mesma hialina distinta (Figura 25).



Figura 25 - Observação ao microscópio de juvenis de segundo estágio do género *Meloidogyne*. Juvenil: (a) região anterior; (b) região da cauda, (c) nemátode completo (bar = 20 μ m) (fonte: Rusinque et al., 2022).

No Quadro 3, estão expostos os resultados do município da Vila Franca, obtidos de apenas duas localizações diferentes, provenientes de uma freguesia das seis existentes, mais concretamente da freguesia de Ribeira Seca, obtendo-se duas amostras da cultura da batata.

Quadro 3 - Detecção de *Meloidogyne* sp. em amostras de 400 gramas, de solos hortícolas do município de Vila Franca

Coordenadas (°,min,s, )	Local (Concelho)	Nº Amostra	Local (Freguesia)	Número de Juvenis (J2) <i>Meloidogyne</i> sp.
37° 43' 25.704" N 25° 25' 11.182" W	Vila Franca	38	Ribeira Seca	23
37° 43' 29.244" N 25° 25' 15.093" W		80	Ribeira Seca	0

Neste município foram encontrados apenas 23 nemátodes do género *Meloidogyne* em uma das duas amostras recolhidas, correspondendo a 50% das amostras recolhidas no concelho.

As duas amostras analisadas foram provenientes de culturas ao ar livre, ou seja, os 23 nemátodes detetados foram todos provenientes de ar livre.

No Quadro 4, estão apresentados os resultados do município de Nordeste, obtidos de sete parcelas diferentes, provenientes de duas freguesias das nove existentes, mais especificamente das freguesias da Achadinha e de Santo António Nordestino, sendo todas as amostras recolhidas da cultura da batata.

Neste município foram encontrados apenas 23 nemátodes do género *Meloidogyne* em três das sete amostras analisadas, correspondendo a 42,8% das amostras recolhidas no concelho, tendo a maior densidade populacional uma amostra contendo 16 nemátodes.

Quadro 4 - Detecção de *Meloidogyne* sp. em amostras de 400 gramas, de solos hortícolas do município de Nordeste

Coordenadas (°,min,s,⊙)	Local (Concelho)	Nº Amostra	Local (Freguesia)	Número de Juvenis (J2) <i>Meloidogyne</i> sp.
37° 51' 9.349" N 25° 17' 32.626" W	Nordeste	95	Achadinha	6
37° 49' 25.490" N 25° 17' 3.584" W		96	Achadinha	1
37° 49' 41.358" N 25° 17' 19.079" W		97	Achadinha	0
37° 50' 55.259" N 25° 13' 5.135" W		98	Santo Antonio Nordestino	0
37° 51' 10.170" N 25° 12' 52.722" W		99	Santo Antonio Nordestino	0
37° 51' 14.227" N 25° 12' 27.342" W		100	Santo Antonio Nordestino	16
37° 50' 59.352" N 25° 12' 17.543" W		101	Santo Antonio Nordestino	0

Podemos observar no quadro 5, um resumo dos resultados obtidos no município de Ponta Delgada, estando no anexo 1 os resultados mais detalhados. As amostras foram provenientes de 14 localizações diferentes, seis freguesias das 25 existentes, mais concretamente das freguesias de Arrifes, Livramento, Mosteiros, São Pedro, São Roque e Ginetes, num total de 39 amostras.

As 39 amostras foram provenientes de 20 culturas diferentes (80% das culturas em estudo), sendo 17 parcelas cultivadas em estufa (43,6%) e 22 em ar livre (56,4%).

A alface predominou, totalizando sete amostras (17,9%), seguindo-se a batata com seis amostras (15,4%), e em terceiro lugar o tomate, com três amostras (7,7%). Neste concelho foram detetados um total de 662 nemátodes *Meloidogyne* sp. em 33 amostras, correspondendo a 84,6% das amostras recolhidas no concelho. A cultura com maior número de indivíduos foi a alface, com 337 nemátodes em cinco de sete amostras, cerca de 50,9% dos nemátodes encontrados, sendo que só numa amostra foram contados 258 indivíduos. Seguiu-se a batata, com 65 indivíduos (9,8%) nas seis amostras em estudo, e em terceiro lugar o tomate com 58 nemátodes (8,8%) nas três amostras analisadas.

Das 33 amostras com presença de nemátodes, 14 foram provenientes de culturas protegidas e 19 de culturas ao ar livre, sendo encontrados 509 indivíduos em estufa e apenas 153 em ar livre.

Quadro 5 - Detecção de *Meloidogyne* sp. em amostras de 400 gramas, de solos hortícolas do município de Ponta Delgada

Município	Nº Total de amostras	Freguesia	Culturas prediletas	Estufa/ Ar Livre	Número de Juvenis (J2) <i>Meloidogyne</i> sp.
Ponta Delgada	39	Arrifes	Alface Batata Tomate	Estufa (14) Ar livre (19)	313
		Ginetes			54
		Livramento			72
		Mosteiros			2
		São Pedro			4
		São Roque			220

No Quadro 6 estão apresentados em resumo, os resultados do município de Ribeira Grande, estando o quadro com a totalidade dos resultados no anexo 2. As amostras foram recolhidas de 30 localizações diferentes, provenientes de sete freguesias das 14 existentes, mais concretamente das freguesias de Calhetas, Fenais da Ajuda, Lomba de São Pedro, Pico da Pedra, Rabo de Peixe, Ribeira Seca e Ribeirinha, obtendo-se 44 amostras.

Quadro 6 - Detecção de *Meloidogyne* sp. em amostras de 400 gramas, de solos hortícolas do município de Ribeira Grande

Município	Nº Total de amostras	Freguesia	Culturas prediletas	Estufa/ Ar Livre	Número de Juvenis (J2) <i>Meloidogyne</i> sp.
Ribeira Grande	44	Calhetas	Batata Couve Repolho Morango	Estufa (10) Ar livre (34)	38
		Fenais da Ajuda			548
		Lomba de São Pedro			69
		Pico da Pedra			6
		Rabo de Peixe			114
		Ribeira Seca			7
		Ribeirinha			86

As amostras referidas foram colhidas de 14 culturas diferentes (56% das culturas em estudo), sendo 34 cultivadas em ar livre (77,3%) e 10 em estufa (22,7%). A cultura predominante foi a batata com 25 amostras (56,8%), seguindo-se o tomate e o pepino com três amostras (6,8%), em terceiro lugar surge a couve repolho e o morango, com duas amostras cada (4,5%).

Na Ribeira Grande foram encontrados 868 nemátodes do género *Meloidogyne* em 26 amostras das 44 recolhidas, correspondendo a 59,1% das amostras colhidas no concelho. A cultura com maior número de indivíduos foi a batata num total de 713 nemátodes em 13 de 25 amostras, cerca de 82,1% dos nemátodes encontrados, realçando-se que só numa amostra foram detetados 487 indivíduos. Em segundo lugar, posicionou-se a couve repolho com um total de 57 indivíduos (6,5%) apenas em uma

amostra das duas existentes, e em terceiro lugar o morango com 39 nemátodes (4,5%) nas duas amostras analisadas.

Das 26 amostras com presença de *Meloidogyne* spp., 18 de culturas ao ar livre e apenas oito provenientes de culturas protegida, foram encontrados 822 indivíduos em ar livre e apenas 46 em estufa.

No Quadro 7, apresentam-se os resultados do município da Lagoa, obtidos de 6 localizações diferentes, provenientes de duas freguesias das cinco existentes, mais concretamente as freguesias de Água de Pau e Santa Cruz, dando origem a nove amostras de solo.

As amostras foram extraídas de cinco culturas diferentes (20% das culturas em estudo), das quais duas cultivadas em estufa (22,2%) e as restantes sete em ar livre (77,7%). O maior número de amostras foi o da cultura da batata com 5 amostras (55,5%), sendo as quatro amostras restantes provenientes de quatro culturas diferentes.

Quadro 7 - Detecção de *Meloidogyne* sp. em amostras de 400 gramas, de solos hortícolas do município de Lagoa


Coordenadas (°,min,s,Ⓟ)	Local (Concelho)	Nº Amostra	Local (Freguesia)	Cultura	Número de Juvenis (J2) <i>Meloidogyne</i> sp.
37° 43' 4.717" N 25° 29' 35.569" W	Lagoa	33	Água de Pau	Batata	8
37° 42' 39.122" N 25° 30' 12.174" W		34	Água de Pau	Batata	0
37° 44' 15.399" N 25° 33' 13.514" W		35	Santa Cruz	Batata	27
37° 44' 21.984" N 25° 32' 55.262" W		36	Santa Cruz	Batata	15
37° 43' 8.424" N 25° 29' 37.355" W		37	Santa Cruz	Batata	8
37° 44' 34.365" N 25° 33' 17.830" W		59	Santa Cruz	Alface	30
		60	Santa Cruz	Tomate	1
		61	Santa Cruz	Salsa	0
		62	Santa Cruz	Couve	4

No concelho de Lagoa, foram detetados 93 nemátodes do género *Meloidogyne* em sete amostras das nove extraídas, correspondendo a 77,7% das amostras recolhidas no município. A cultura com maior número de indivíduos foi a batata num total de 58 nemátodes em quatro das cinco amostras recolhidas, cerca de 62,4%. Em segundo lugar, posicionou-se a alface com um total de 30 indivíduos (32,3%), em apenas uma amostra recolhida, e em terceiro lugar a couve de folhas com quatro nemátodes (4,3%) em apenas uma amostra analisada.

Nas sete amostras em que foram identificados nemátodes do género *Meloidogyne*, cinco de culturas ao ar livre e apenas duas provenientes de culturas protegida, contabilizaram-se 62 indivíduos em ar livre e apenas 31 em estufa.

No Quadro 8, resumem-se os resultados do município da Povoação, obtidos de quatro locais diferentes, de duas freguesias das seis existentes, mais especificamente das freguesias da Vila da Povoação e Nossa Senhora dos Remédios. Todas as amostras foram retiradas da cultura da batata. Identificaram-se 147 nemátodes do género *Meloidogyne*, estando presentes nemátodes em todas as amostras, correspondendo a 100% das amostras recolhidas no concelho, tendo-se registado a maior densidade populacional (72 indivíduos J2) uma amostra colhida na Vila da Povoação.

Quadro 8 - Deteção de *Meloidogyne* sp. em amostras de 400 gramas, de solos hortícolas do município de Povoação

Coordenadas (°,min,s, )	Local (Concelho)	Nº Amostra	Local (Freguesia)	Cultura	Número de Juvenis (J2) <i>Meloidogyne</i> sp.
37° 44' 51.922" N 25° 15' 52.858" W	Povoação	102	Vila da Povoação	Batata	72
37° 44' 57.725" N 25° 15' 36.083" W		103	Vila da Povoação	Batata	2
37° 45' 35.647" N 25° 14' 11.785" W		104	Nossa Senhora dos Remédios	Batata	36
37° 44' 57.588" N 25° 15' 33.660" W		105	Nossa Senhora dos Remédios	Batata	37

Relativamente ao número de nemátodes juvenis (J2) do género *Meloidogyne* identificados nas amostras, pretendeu-se ainda relacionar o número médio de nemátodes juvenis de *Meloidogyne* por concelho, tendo por objetivo verificar quais os concelhos com maior densidade populacional de nemátodes (Figura 26). Em primeiro lugar surge o município da Povoação com 36 nemátodes por amostra de 400 gramas de solo, posicionando-se de seguida o concelho da Ribeira Grande com praticamente 19 nemátodes por amostra de 400 gramas de solo e em terceiro lugar o município de Ponta Delgada com 17 nemátodes por amostra de 400 gramas de solo. Ainda assim, embora o concelho da Povoação apresente os valores mais elevados de densidade populacional, os resultados poderão não refletir a realidade, uma vez que se baseiam apenas em quatro amostras recolhidas neste município. Já os resultados obtidos para os concelhos de Ribeira Grande e de Ponta Delgada serão mais representativos, uma vez que o número de amostras analisadas foi superior. Importa salientar que estes dois

concelhos são os que detêm maior número de explorações que se dedicam à horticultura e que apresentam menor declive.

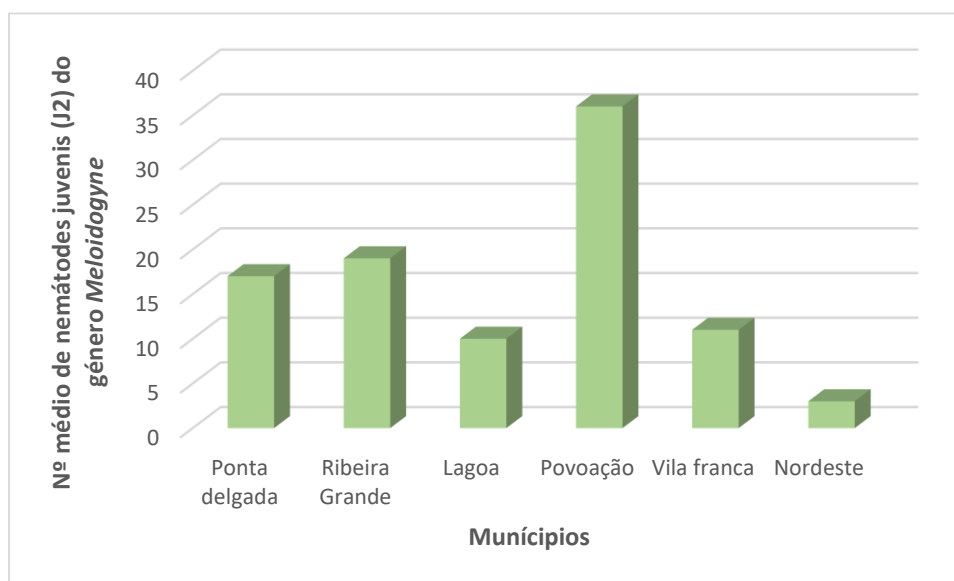


Figura 26 - Número médio de nemátodes juvenis (J2) (por 400 g de solo) do género *Meloidogyne* em cada um dos municípios em estudo.

Relacionando o número de nemátodes juvenis (J2) do género *Meloidogyne* com as culturas onde foram encontrados, salienta-se a cultura da batata com um total superior a 1000 nemátodes encontrados nas 49 amostras associadas a esta cultura, a que corresponde uma média de 22 nemátodes por amostra de 400 gramas de solo (Figura 27). Este valor, embora baixo, poderá aumentar de forma exponencial, levando a prejuízos relevantes para a horticultura açoriana, pois a cultura da batata na Região Autónoma dos Açores é a que tem maior relevância económica (Rusique et al., 2022).

A cultura da alface com um total de aproximadamente 400 nemátodes por 400 gramas de solo, num total de nove amostras, corresponde a uma média de 44 nemátodes por amostra, o dobro da densidade populacional encontrada na cultura da batata. As restantes culturas têm densidades populacionais muito inferiores, sendo pouco relevantes.

No presente estudo, realizado na Ilha de S. Miguel, Açores, foram identificados nemátodes das galhas radiculares (*Meloidogyne* spp.) numa diversidade de culturas considerável, sendo as mais afetadas a batateira, a alface e a couve repolho. Em Portugal continental, sendo a batateira também a cultura mais afetada por estes nemátodes, seguem-se-lhe o tomateiro e a cenoura (Rusique et al., 2018). A elevada diversidade de culturas afetadas reflete a elevada polifagia apresentada por este género

de nemátodes, sendo que a lista de hospedeiros, em Portugal, é ainda muito incompleta. Um estudo recente, levado a efeito no país, permitiu identificar 22 plantas hospedeiras diferentes, principalmente culturas hortícolas de ar livre e também gramíneas, plantas ornamentais e fruteiras, parasitadas por nemátodes *Meloidogyne* (Rusique et al., 2023).

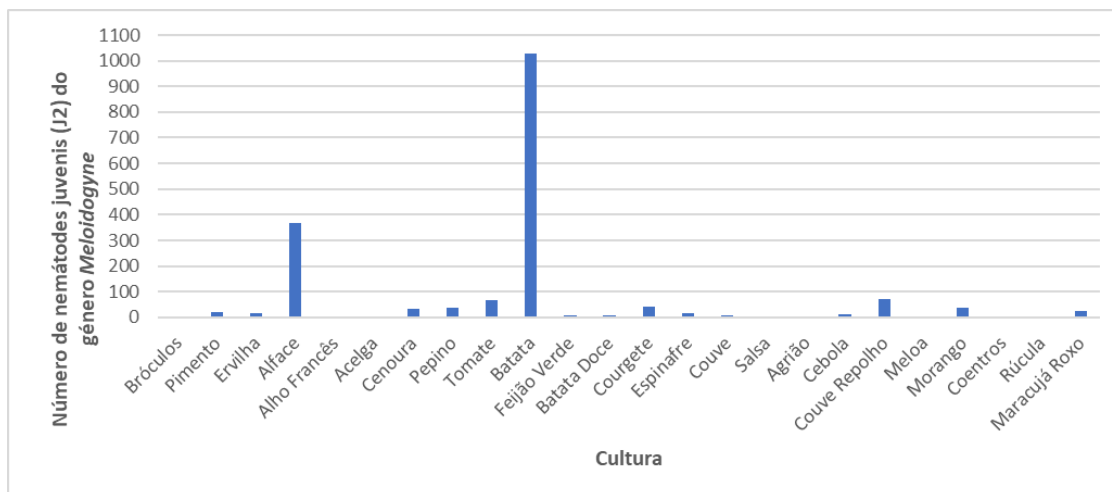


Figura 27 - Número de nemátodes juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* sp. (em 400 g de solo), por cultura.

4.2 Biotestes com *Meloidogyne* sp.

Depois de efetuada a pré-seleção das amostras, apenas as que continham indivíduos J2 de *Meloidogyne* sp., passaram para bioteste. O bioteste foi considerado positivo sempre que foram observadas galhas radiculares nas plantas de tomateiro, variedade Coração-de-Boi (indicadora), caso contrário foi negativo.

Em Vila Franca, das duas amostras recolhidas, apenas numa foi realizado bioteste, tendo este um resultado positivo (Quadro 9).

Quadro 9 - Resultado dos biotestes das amostras do município de Vila Franca

Coordenadas (°,min,s,⊙)	Local (Concelho)	Nº Amostra	Local (Freguesia)	Resultado Bioteste <i>Meloidogyne</i> sp.	Data de Início dos Biotestes	Data de Fim dos Biotestes
37° 43' 25.704" N 25° 25' 11.182" W	Vila Franca	38	Ribeira Seca	Positivo	16/04/2021	15/06/2021
37° 43' 29.244" N 25° 25' 15.093" W		80	Ribeira Seca	Não Efetuado		

Por sua vez, das quatro amostras recolhidas do concelho de Povoação, todas elas foram submetidas a bioteste, sendo que três delas deram resultado positivo e apenas um negativo (Quadro 10).

Quadro 10 - Resultado dos biotestes das amostras do município da Povoação

Coordenadas (°,min,s, ^g)	Local (Concelho)	Nº Amostra	Local (Freguesia)	Resultado Bioteste <i>Meloidogyne</i> sp.	Data de Início dos Biotestes	Data de Fim dos Biotestes
37° 44' 51.922" N 25° 15' 52.858" W	Povoação	102	Vila da Povoação	Positivo	11/11/2021	10/01/2021
37° 44' 57.725" N 25° 15' 36.083" W		103	Vila da Povoação	Negativo	11/11/2021	10/01/2021
37° 45' 35.647" N 25° 14' 11.785" W		104	Nossa Senhora dos Remédios	Positivo	11/11/2021	10/01/2021
37° 44' 57.588" N 25° 15' 33.660" W		105	Nossa Senhora dos Remédios	Positivo	11/11/2021	10/01/2021

Do concelho de Nordeste, duas das três amostras de solo em que foram realizados biotestes apresentaram resultado positivo (Quadro 11).

Quadro 11 - Resultado dos biotestes das amostras do município do Nordeste

Coordenadas (°,min,s, ^g)	Local (Concelho)	Nº Amostra	Local (Freguesia)	Resultado Bioteste <i>Meloidogyne</i> sp.	Data de Início dos Biotestes	Data de Fim dos Biotestes
37° 51' 9.349" N 25° 17' 32.626" W	Nordeste	95	Achadinha	Positivo	11/11/2021	10/01/2021
37° 49' 25.490" N 25° 17' 3.584" W		96	Achadinha	Negativo	11/11/2021	10/01/2021
37° 49' 41.358" N 25° 17' 19.079" W		97	Achadinha	Não Efetuado		
37° 50' 55.259" N 25° 13' 5.135" W		98	Santo Antonio Nordestino	Não Efetuado		
37° 51' 10.170" N 25° 12' 52.722" W		99	Santo Antonio Nordestino	Não Efetuado		
37° 51' 14.227" N 25° 12' 27.342" W		100	Santo Antonio Nordestino	Positivo	11/11/2021	10/01/2021
37° 50' 59.352" N 25° 12' 17.543" W		101	Santo Antonio Nordestino	Não Efetuado		

Quadro 12 – Resumo dos resultados dos biotestes das amostras do município de Ponta Delgada

Município	Nº Total de Biotestes	Freguesia	Positiva	Negativa	Inconclusiva	Número de Biotestes
Ponta Delgada	34	Arrifes	2	2	2	6
		Ginetes	0	2	5	7
		Livramento	2	3	0	5
		Mosteiros	1	0	0	1
		São Pedro	1	1	0	2
		São Roque	9	2	2	13
Totais			15	10	9	34

No que se refere ao município de Ponta Delgada, foram a bioteste 34 amostras, dentre as quais, nove foram inconclusivas, pois as plantas destas amostras sofreram um ataque de oídio, não havendo mais solo para proceder a novo bioteste (Quadro 12). Das restantes 25 amostras, 10 deram resultado negativo e 15 positivo, estando o quadro de resultados completo no anexo 3.

Quadro 13 - Resultado dos biotestes das amostras do município da Lagoa

Coordenadas (°,min,s,Ⓟ)	Local (Concelho)	Nº Amostra	Local (Freguesia)	Resultado Bioteste <i>Meloidogyne</i> sp.	Data de Início dos Biotestes	Data de Fim dos Biotestes
37° 43' 4.717" N 25° 29' 35.569" W	Lagoa	33	Água de Pau	Positivo	29/03/2021	28/05/2021
37° 42' 39.122" N 25° 30' 12.174" W		34	Água de Pau	Não Efetuado		
37° 44' 15.399" N 25° 33' 13.514" W		35	Santa Cruz	Positivo	29/03/2021	28/05/2021
37° 44' 21.984" N 25° 32' 55.262" W		36	Santa Cruz	Positivo	16/04/2021	15/06/2021
37° 43' 8.424" N 25° 29' 37.355" W		37	Santa Cruz	Inconclusivo	16/04/2021	15/06/2021
37° 44' 34.365" N 25° 33' 17.830" W		59	Santa Cruz	Inconclusivo	28/04/2021	28/06/2021
		60	Santa Cruz	Inconclusivo	28/04/2021	28/06/2021
		61	Santa Cruz	Não Efetuado		
	62	Santa Cruz	Inconclusivo	28/04/2021	28/06/2021	

Com origem no município da Lagoa, foram submetidas sete amostras a bioteste, sendo os resultados de quatro foram inconclusivos, pois as plantas sofreram também com o ataque de oídio. Das restantes três amostras, todas deram resultado positivo (Quadro 13).

Da Ribeira Grande submeteram-se a bioteste 26 amostras, das quais oito foram inconclusivas, pois as plantas sofreram igualmente um ataque de oídio, e não houve solo repetir o bioteste (Quadro 14). Das restantes amostras (18), nove deram resultado

positivo para *Meloidogyne* sp. e nove negativo. O quadro de resultados completo, encontra-se no anexo 4.

Quadro 14 - Resumo dos resultados dos biotestes das amostras do município da Ribeira Grande

Município	Nº Total de Biotestes	Freguesia	Positiva	Negativa	Inconclusiva	Número de Biotestes
Ribeira Grande	26	Calhetas	1	1	0	2
		Fenais da Ajuda	2	1	0	3
		Lomba de São Pedro	0	1	0	1
		Pico da Pedra	1	2	0	3
		Rabo de Peixe	4	4	3	11
		Ribeira Seca	0	0	5	5
		Ribeirinha	1	0	0	1
Totais			9	9	8	26

4.3 Análise Bioquímica

As raízes com galhas radiculares das várias plantas de cada amostra foram enviadas para o INIAV, para extração das fêmeas e realização da eletroforese em gel de poliacrilamida para a determinação do perfil da esterase e posterior identificação da espécie. Os fenótipos utilizados como padrão foram os elaborados por Esbenshade & Triantaphyllou, (1990), sendo estes os mais comumente utilizados nas identificações bioquímicas de nemátodes, assegurando-se assim resultados fidedignos.

As bandas que apareceram no gel da eletroforese do fenótipo I2 da espécie *M. incognita* apresentaram-se no geral ligeiramente abaixo da primeira banda de referência e com uma mobilidade relativa Rm: 1,04 e Rm: 1,11.

No caso da identificação da espécie *M. arenaria*, as bandas do fenótipo A2 apareceram geralmente entre a primeira e segunda banda de referência e com uma mobilidade relativa de Rm: 1,16 e Rm: 1,22.

Em relação à espécie *M. javanica*, o fenótipo J3 foi utilizado em todas as amostras como referência, para determinar a posição relativa das outras espécies e da própria espécie, sendo a mobilidade relativa Rm:1, Rm:1,17, Rm:1,26, como se pode observar na Figura 28.

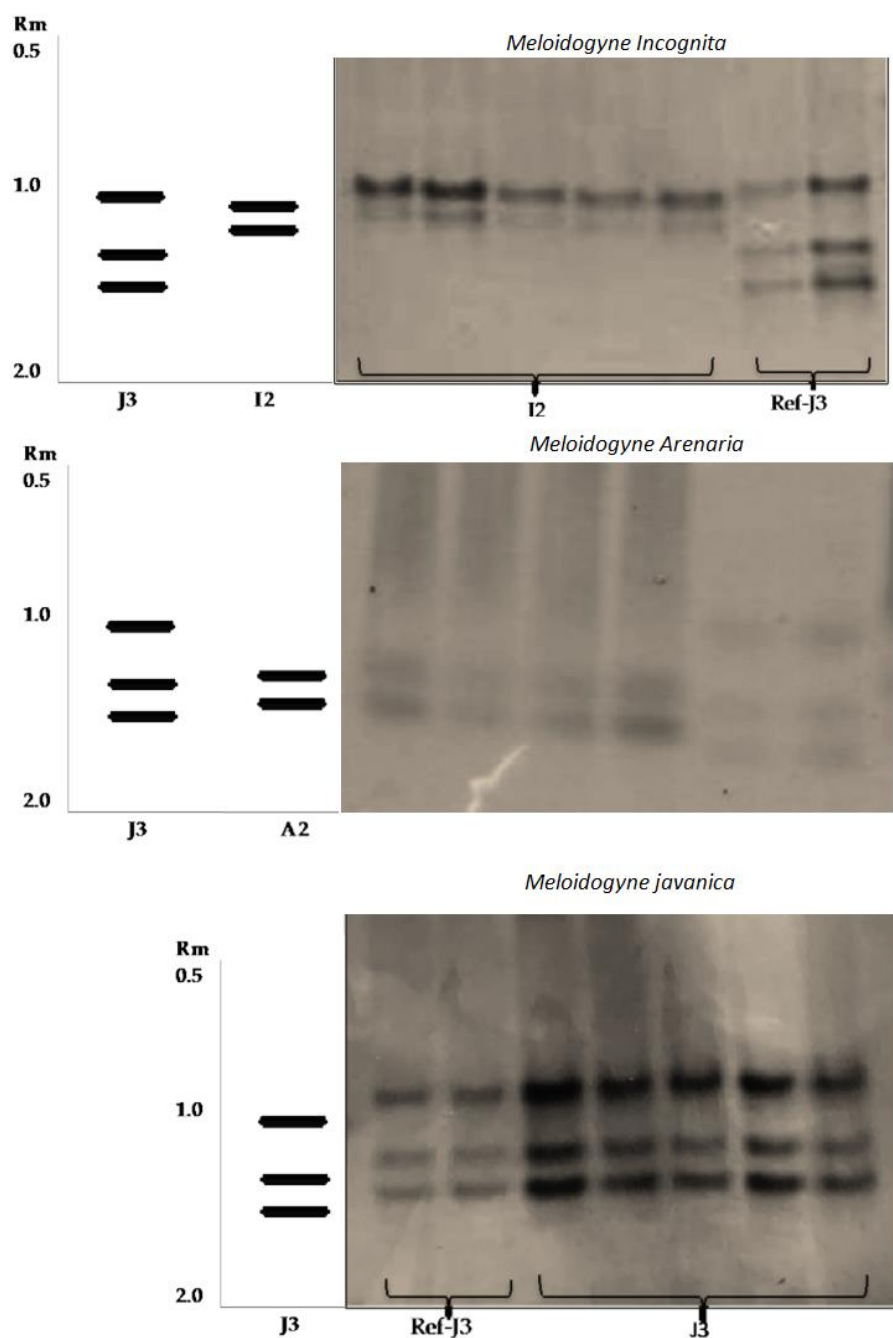


Figura 28 - Fenótipos das esterases de homogenatos de proteínas dos ovos das fêmeas das espécies *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica* e respectivas ilustrações de referência (fonte: Lab Nematologia INIAV).

A identificação das espécies do género *Meloidogyne* foi efetuada em apenas 33 amostras, pois unicamente estas apresentaram bioteste positivo, com galhas para que permitissem avançar para a análise bioquímica. Destas 33 amostras, apenas foi

possível identificar a espécie em 20, sendo que nas restantes 13 amostras não foi possível fazê-lo, porque as raízes não chegaram em boas condições às instalações do INIAV, e o material biológico não estava em condições para a eletroforese.

As restantes 72 amostras, do total das 105 amostras, não foram submetidas a eletroforese 20, porque o resultado do bioteste foi negativo 31, porque não foram detetados indivíduos do segundo estágio J2 e 21 amostras, por terem sido observados resultados inconclusivos nos biotestes, devido aos ataques de oídio e não haver mais solo para proceder a novo bioteste.

No presente estudo, foram identificadas as três espécies do género *Meloidogyne*, mais dispersas a nível mundial, *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica*, estando *M. incognita* presente em 16 das 20 amostras, correspondendo a cerca de 80% das amostras em que efetivamente se procedeu a uma identificação, e 15,2% das 105 amostras iniciais. Nas condições estudadas, *M. incognita* surge, portanto, como a espécie predominante na Ilha de S. Miguel, Açores.

Meloidogyne incognita foi identificada em 10 amostras provenientes de culturas em estufa e apenas seis em ar livre, representando 62,5% das amostras em estufa e 37,5% ao ar livre. Quanto aos municípios de onde as amostras eram oriundas, 11 eram originárias de Ponta Delgada, uma de Ribeira Grande, três de Lagoa e uma de Vila Franca.

A cultura da batata foi a hospedeira predileta de *M. incognita*, estando presente em cinco amostras, seguindo-se a alface em duas, e com apenas uma amostra positiva em acelga, brócolos, curgete, ervilha, espinafre, feijão verde, pepino e tomate.

Quanto a *M. arenaria*, esta espécie foi encontrada em apenas duas das 20 amostras, equivalendo a 10% das amostras em que de facto se obteve uma identificação, e a 1,9% das 105 amostras recolhidas, sendo uma amostra de ar livre e outra de estufa, ambas provenientes do município de Ribeira Grande. Esta espécie foi encontrada em duas culturas diferentes sendo elas a couve repolho e o feijão verde, a primeira em ar livre e a segunda em estufa.

Meloidogyne javanica foi detetada em apenas duas das 20 amostras, representando 10% das amostras submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e a 1,9% das 105 amostras iniciais, sendo encontrada apenas em estufa, em duas culturas diferentes: espinafres e tomate. Tendo sido *M. javanica* a primeira espécie a ser assinalada na região (Rusique et al., 2018) seria de esperar que estivesse mais dispersa

A densidade populacional de *M. arenaria* e *M. javanica* foi de 20 – 25 nemátodes por 400 gramas de solo, enquanto a de *M. incognita* foi superior, com 35 – 45 nemátodes por 400 gramas de solo.

Em resumo, as principais espécies de *Meloidogyne* identificadas na ilha de S. Miguel, quer em ar livre quer em cultura protegida foram as pertencentes ao grupo “tropical”, e as mais amplamente distribuídas em todo o mundo, estando cada vez mais adaptadas ao clima temperado. Em relação à sua presença na ilha de S. Miguel, *M. incognita* foi detetada em todos os concelhos prospetados, enquanto *M. arenaria* e *M. javanica* foram encontradas mais localmente (Figura 29).

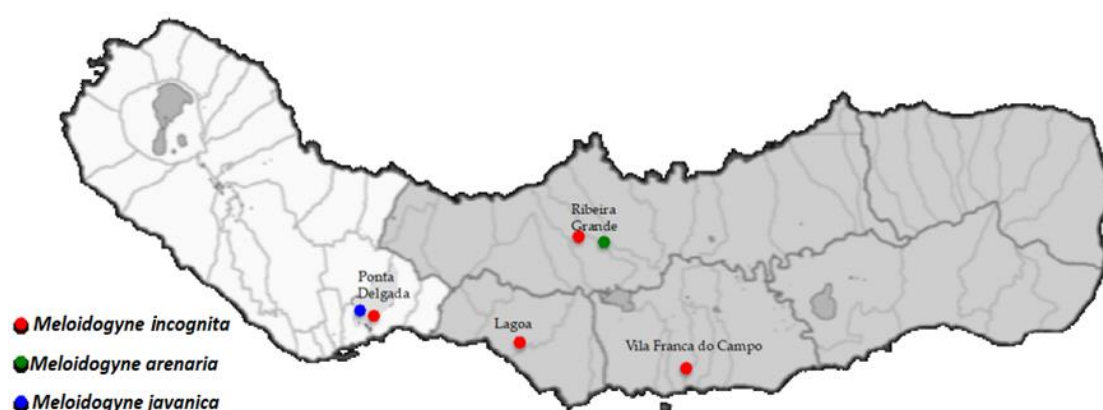


Figura 29 - Municípios onde foram identificadas as espécies de *Meloidogyne* na Ilha de São Miguel, Açores (Rusique et al., 2022)

Na figura 30, procede-se a uma síntese dos resultados obtidos na identificação bioquímica, encontrando-se no município de Ponta Delgada, o maior número de amostras com espécies de *Meloidogyne* identificadas, neste caso 13, sendo 11 da espécie *M. incognita* e apenas duas de *M. javanica*. Segue-se o concelho de Ribeira Grande com três amostras no total, sendo uma de *M. incognita* e duas de *M. arenaria*. No município da Lagoa apenas foram identificadas amostras com *M. incognita* num total de três amostras e em Vila Franca foi identificada apenas uma espécie *M. incognita* em

uma amostra. Nos restantes dois municípios, não foi identificada nenhuma espécie de *Meloidogyne*.

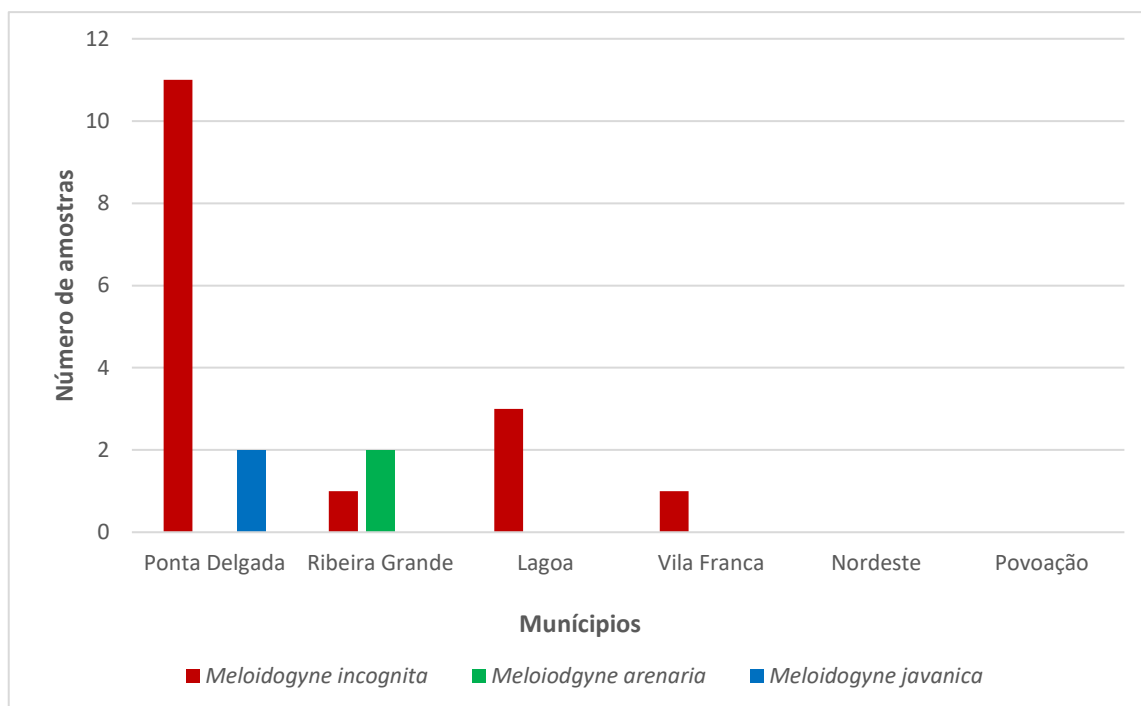


Figura 30 - Síntese de resultados da identificação bioquímica (perfil das esterases) de *Meloidogyne* spp.

De salientar que foram apenas identificadas amostras com as três espécies de *Meloidogyne* mais comuns a nível mundial. A espécie *M. luci*, assinalada pela primeira vez na região dos Açores em 2021 (Rusique et al., 2021), não foi identificada no presente estudo, o que parece indicar que não se encontra dispersa na Ilha de S. Miguel, Açores.

Os resultados obtidos no âmbito desta dissertação contribuíram para o artigo “*Root-knot nematode species associated with horticultural crops in the Island of Azores*” (Rusique et al., 2022), que constituiu o primeiro levantamento realizado em culturas hortícolas na ilha de São Miguel, Açores, quanto a *Meloidogyne* spp.

V. Conclusão

Os nemátodes são um problema crescente na atividade agrícola, e no caso dos nemátodes das galhas radiculares, *Meloidogyne* spp., esse impacto é agravado devido à elevada capacidade destes nemátodes em parasitar novas espécies de plantas e adaptar-se a diferentes condições edafoclimáticas. Este facto é ainda mais premente num cenário de alterações climáticas e de maior suscetibilidade das culturas ao ataque de pragas e doenças.

Tendo em conta esta situação, o presente estudo veio contribuir com informação acerca da prevalência das espécies dos géneros *Meloidogyne* e *Globodera* nas culturas hortícolas em todos os municípios da ilha de São Miguel, de uma forma exaustiva.

Estes resultados são particularmente relevantes pois foram identificadas as espécies presentes nos diversos municípios. Isto tem como consequência imediata que os produtores dessas regiões poderão equacionar medidas mais adequadas no que respeita ao binómio cultura-nemátode fitoparasita e, também, uma vez que foram envolvidos neste trabalho, estarem mais alerta para o aparecimento de sintomas e sinais suspeitos do ataque de nemátodes radiculares, colmatando a falta de informação até aqui existente.

Além disso, este estudo foi um complemento à prospeção de nemátodes anualmente implementada pela Direção Regional, sob a responsabilidade da DGAV. Era sabido que qualquer nemátode de quarentena que fosse encontrado teria logo de ser comunicado às entidades responsáveis, mas não houve nenhum registo destes organismos nas amostras analisadas.

Em relação aos nemátodes do género *Globodera*, não foi detetado nenhum indivíduo em todas as amostras observadas, o que permite concluir que os nemátodes de quisto da batateira, apesar de presentes na ilha, terão uma distribuição limitada. De fato, até 2020, os Açores eram considerados como zona isenta dos NQB (Inácio et al., 2020), de acordo com o Regulamento da Comissão Europeia CE 690/2008, atualizado pelo Regulamento de Implementação UE 2016/873. O seu estatuto passou a ser “presente, com poucas ocorrências” e este estudo vem confirmar essa informação. Contudo, deverá manter-se um bom nível de alerta para a sua deteção, e todos os cuidados para prevenir novas introduções e decorrente dispersão, principalmente com a batata de semente importada.

Quanto a *Meloidogyne* spp., foram identificadas as três espécies de *Meloidogyne* mais comuns na horticultura (Conceição et al., 2009), e que tendem a afetar mais as produções, sendo *M. incognita* a espécie detetada com maior frequência (16 amostras), seguida de *M. arenaria* e *M. javanica* detetadas em apenas duas amostras cada.

A densidade populacional encontrada foi relativamente baixa para todas as espécies, tendo *M. incognita* cerca de 35–45 nemátodes por 400 gramas de solo e as outras duas espécies 20–25 nemátodes por 400 gramas de solo.

É de salientar que das 105 amostras iniciais, excluindo as 21 inconclusivas e as 31 em que não foram detetados juvenis de *Meloidogyne* sp., nas restantes 53 amostras, nas quais foi concluído o bioteste, obtiveram-se 33 amostras com resultado positivo para *Meloidogyne* spp., ou seja cerca de 62.3%.

De maneira geral, a erradicação de nemátodes é muito difícil, e torna-se ainda mais complexa quando se trata de espécies de *Meloidogyne*. A capacidade de se adaptarem a condições temperadas e a sua ampla gama de hospedeiros, tornam o seu controlo uma tarefa complicada. Além disso, diversos nematodocidas foram recentemente regulamentados ou proibidos na União Europeia, devido aos impactos adversos no meio ambiente e na saúde humana, reduzindo as alternativas no que respeita a meios de proteção contra estes agentes. Portanto, para definir estratégias sustentáveis, é necessário um diagnóstico preciso e conhecimento sobre a(s) espécie(s), sendo a combinação de análises morfológicas, bioquímicas e moleculares a abordagem mais eficaz para a identificação destas espécies (Rusique et al., 2021). A espécie de quarentena *M. luci*, identificada em batata e outros hospedeiros em Portugal continental (Maleita et al., 2018; Santos et al., 2019) e mesmo nos Açores (Rusique et al., 2021), não foi detetada neste estudo, apontando para a sua distribuição restrita na região.

Os nemátodes das galhas radiculares representam uma ameaça generalizada, causando danos economicamente significativos em várias culturas. Entre eles, *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica* apresentam desafios particulares devido à sua reprodução rápida, curto tempo de geração e amplo espectro de hospedeiros. O conhecimento das espécies de *Meloidogyne* numa determinada zona ou cultura é crucial para o desenvolvimento de estratégias eficazes gestão, bem como para fins de quarentena. Este trabalho perfila-se como a primeira avaliação da presença destes nemátodes na ilha de São Miguel, Açores e os resultados obtidos constituem a primeira deteção de *M. incognita* em brócolos, ervilha, acelga, pepino e courgette; de *M. arenaria* em feijão verde e couve repolho; e de *M. javanica* em espinafres em termos nacionais, contribuindo com conhecimento relevante para a distribuição dos nemátodes das galhas radiculares em Portugal e na Europa.

VI. Referências Bibliográficas

- Abrantes, I., & Santos, M. (1991). *Meloidogyne lusitanica* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a Root-knot Nematode Parasitizing Olive Tree (*Olea europaea* L.). *Journal of Nematology*, 23, 210–224.
- Ali, M. A., Azeem, F., Li, H., & Bohlmann, H. (2017). Smart Parasitic Nematodes Use Multifaceted Strategies to Parasitize Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01699>
- Back, M. A., Cortada, L., Grove, I. G., & Taylor, V. (2018). Field management and control strategies. In R.N. Perry (Ed.), *Cyst Nematodes*, (pp. 305–336). In CABI International. <https://doi.org/10.1079/9781786390837.0305>
- Bairwa, A., Venkatasalam, E. P., Priyank, H. M., & Sharma, S. (2021). Introduction of Potato Cyst Nematodes, Life Cycle and Their Management Through Biobased Amendments. In M. Kaushal & R. Prasad (Eds.), *Microbial Biotechnology in Crop Protection* (pp. 79–95). In Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0049-4_3
- Bardgett, R. D., & van der Putten, W. H. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, 515(7528), 500–522. <https://doi.org/10.1038/nature13855>
- Blanc-Mathieu, R., Perfus-Barbeoch, L., Aury, J.-M., Da Rocha, M., Gouzy, J., Sallet, E., Martin-Jimenez, C., Bailly-Bechet, M., Castagnone-Sereno, P., Flot, J.-F., Kozłowski, D. K., Cazareth, J., Couloux, A., Da Silva, C., Guy, J., Kim-Jo, Y.-J., Rancurel, C., Schiex, T., Abad, P., ... Danchin, E. G. J. (2017). Hybridization and polyploidy enable genomic plasticity without sex in the most devastating plant-parasitic nematodes. *PLOS Genetics*, 13(6), 1–36. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006777>
- Blok, V. C., & Powers, T. O. (2009). Biochemical and Molecular Identification. In R. N. Perry, M. Moens & J. L. Starr (Eds.) *Root-Knot Nematodes*, (pp. 98–118). In CABI Publishing, Wallingford, UK. <https://doi.org/10.1079/9781845934927.0098>
- Bogale, M., Baniya, A., & DiGennaro, P. (2020). Nematode Identification Techniques and Recent Advances. *Plants*, 9(10), 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants9101260>
- Brodie, B. (1976). Effects of birds ingesting *Heterodera rostochiensis* cysts on viability of eggs and larvae. *Journal of Nematology*, 8(4), 318–322. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620199>
- Caillaud, M.-C., Lecomte, P., Jammes, F., Quentin, M., Pagnotta, S., Andrio, E., de Almeida Engler, J., Marfaing, N., Gounon, P., Abad, P., & Favery, B. (2008). MAP65-3 microtubule-Associated Protein Is Essential for Nematode-Induced Giant Cell Ontogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20(2), 423–437. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057422>
- Camacho, M. J., Andrade, E., Mota, M., Nóbrega, F., Vicente, C., Rusinque, L., & Inácio, M. L. (2020). Potato Cyst Nematodes: geographical distribution, phylogenetic relationships, and integrated pest management outcomes in Portugal. *Frontiers in Plant Science*, 11, 606178. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.606178>

- Camacho, M. J. (2016). Identificação morfológica e molecular de *Globodera pallida* e *Globodera rostochiensis* presentes em campos de batata portuguesas. In Dissertação de Mestrado em Engenharia Agronómica, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, 52 pp.
- Carneiro, R. M. D. G., Correa, V. R., Almeida, M. R. A., Gomes, A. C. M. M., Mohammad Deimi, A., Castagnone-Sereno, P., & Karssen, G. (2014). *Meloidogyne luci* n. sp. (Nematoda: *Meloidogynidae*), a root-knot nematode parasitising different crops in Brazil, Chile and Iran. *Nematology*, 16(3), 289–301. <https://doi.org/https://doi.org/10.1163/15685411-00002765>
- Carneiro, R. M. D. G., Lima, F. S. de O., & Correia, V. R. (2017). Methods and Tools Currently Used for the Identification of Plant Parasitic Nematodes. In M. M. Shah & M. Mahamood (Eds.), *Nematology - Concepts, Diagnosis and Control*. In Tech. Open, Rijeka, Croatia. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69403>
- Castagnone-Sereno, P. (2006). Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. *Heredity*, 96(4), 282–289. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800794>
- Cetintas, R., Kusek, M., & Fateh, S. A. (2018). Effect of some plant growth-promoting rhizobacteria strains on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, on tomatoes. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s41938-017-0008-x>
- Chaudhary, S., Dutta, T. K., Shivakumara, T. N., & Rao, U. (2019). RNAi of esophageal gland-specific gene *Mi-msp-1* alters early-stage infection behaviour of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Journal of General Plant Pathology*, 85(3), 232–242. <https://doi.org/10.1007/s10327-019-00837-x>
- Chitwood, B. G. (1949). Root-knot nematodes – part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Göldi, 1887. In
- Collange, B., Navarrete, M., Peyre, G., Mateille, T., & Tchamitchian, M. (2011). Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: the challenge of an agronomic system analysis. *Crop Protection*, 30(10), 1251–1262. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.04.016>
- Costa, S. R., 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(5), 470–490. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-20-0350-FI>
- Cotton, J. A., Lilley, C. J., Jones, L. M., Kikuchi, T., Reid, A. J., Thorpe, P., Tsai, I. J., Beasley, H., Blok, V., Cock, P. J., Eves-van den Akker, S., Holroyd, N., Hunt, M., Mantelin, S., Naghra, H., Pain, A., Palomares-Rius, J. E., Zarowiecki, M., Berriman, M., ... Urwin, P. E. (2014). The genome and life-stage specific transcriptomes of *Globodera pallida* elucidate key aspects of plant parasitism by a cyst nematode. *Genome Biology*, 15(3), 2–17. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r43>

- Cunha, T. G. da, Visôto, L. E., Lopes, E. A., Oliveira, C. M. G., & God, P. I. V. G. (2018). Diagnostic methods for identification of root-knot nematodes species from Brazil. *Ciência Rural*, 48(2), 1–11. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170449>
- Conceição, I. L., O. Abrantes, I., de A. Santos, M. S., Correia, M., da Cunha, M. J., Feio, G., & dos Santos, M. C. V. (2009). Root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., on potato in Portugal. *Nematology*, 11(2), 311–313. <https://doi.org/10.1163/156854109X415515>
- Decraemer, W., & Hunt, D. J. (2006). Structure and classification. In R. N. Perry & M. Moens (Eds.), *Plant Nematology*, CABI Publishing, Wallingford, UK. (pp. 3–32). <https://doi.org/10.1079/9781845930561.0003>
- Devine, K., & Jones, P. (2003). Investigations into the chemoattraction of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* towards fractionated potato root leachate. *Nematology*, 5(1), 65–75. <https://doi.org/10.1163/156854102765216704>
- DGAV. (2023). Lista de Variedades de Batata Resistentes a *Globodera rostochiensis* ou *G. pallida*. Atualizada pela Direção-Geral de Alimentação e Veterinária em 27/07/2023.
- Dickson, D. W., Huisingh, D., & Sasser, J. N. (1971). Dehydrogenases, Acid and Alkaline Phosphatases, and Esterases for Chemotaxonomy of Selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus* spp. *Journal of Nematology*, 3 (1), 1–16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619843/>
- Eisenback, J. (1985). Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In J. N. Sasser & C. C. Carter (Eds.), *An Advanced Treatise on Meloidogyne: Vol. 1: Biology and Control* (pp. 95–112). North Carolina State University Graphics, Raleigh. <https://www.researchgate.net/publication/233858375>
- EPPO. (2016). PM 7/41 (3) *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne fallax*. *EPPO Bulletin*, 46(2), 171–189. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epp.12292>
- EPPO. (2022a). EPPO A1 AND A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. In *EPPO Standards*, 3–20. <https://www.bing.com/search?q=EPPO+A1+AND+A2+LISTS+OF+PESTS+RECOMMENDED+FOR+REGULATION+AS+QUARANTINE+PESTS&cvid=e945706fa97c43598b0ca7fd7ce83a51&aqs=edge.0.69i59j69i64.486j0j9&FORM=ANAB01&PC=U531>
- EPPO. (2022b). PM 7/40 (5) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *EPPO Bulletin*, 52(2), 286–313. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/epp.12391>
- Esbenshade, P. R., & Triantaphyllou, A. C. (1990). Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 22(1), 5–10.
- Escobar, C., Barcala, M., Cabrera, J., & Fenoll, C. (2015). Overview of Root-Knot Nematodes and Giant Cells. *Advances in Botanical Research*, 73, 1–32. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2015.01.001>
- EU Commission. (2022). Commission implementing Regulation (EU) 2022/1192 of 11 July 2022 establishing measures to eradicate and prevent the spread of *Globodera pallida* (Stone) Behrens and *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens.

Official Journal of the European Union, L 185, 22–26.
http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2022/1192/oj

- European and mediterranean plant protection organization. (2013). PM 7/119 (1) Nematode extraction. *EPPO Bulletin*, 43(3), 471–495. <https://doi.org/10.1111/epp.12077>
- Eves-van den Akker, S., Lilley, C. J., Jones, J. T., & Urwin, P. E. (2015). Plant-parasitic nematode feeding tubes and plugs: new perspectives on function. *Nematology*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1163/15685411-00002832>
- Favery, B., Quentin, M., Jaubert-Possamai, S., & Abad, P. (2016). Gall-forming root-knot nematodes hijack key plant cellular functions to induce multinucleate and hypertrophied feeding cells. *Journal of Insect Physiology*, 84, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.013>
- Fourie, H., Ahuja, P., Lammers, J., & Daneel, M. (2016). Brassicacea-based management strategies as an alternative to combat nematode pests: A synopsis. *Crop Protection*, 80, 21–41. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.10.026>
- Franklin, M. T. (1965). A Root-Knot Nematode, *Meloidogyne naasi* N. sp., On Field Crops in England and Wales. *Nematologica*, 11(1), 79–86. <https://doi.org/10.1163/187529265X00500>
- Gartner, U., Hein, I., Brown, L. H., Chen, X., Mantelin, S., Sharma, S. K., Dandurand, L.-M., Kuhl, J. C., Jones, J. T., Bryan, G. J., & Blok, V. C. (2021). Resisting Potato Cyst Nematodes With Resistance. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.661194>
- Gibbins, J. M. (2004). Techniques for analysis of proteins by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis and western blotting. In J.M. Gibbins & M.P. Mahaut-Smith (Eds.), *Platelets and Megakaryocytes, Methods in Molecular Biology* (Vol. 273, pp. 139–151). In Humana Press, New York. <https://doi.org/10.1385/1-59259-783-1:139>
- Golden, A., O'Bannon, J., Santo, G., & Finley, A. (1980, May 27). Description and SEM observations of *Meloidogyne chitwoodi* n. sp. (*Meloidogynidae*). *Journal of Nematology*, 12(4), 319–327. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618037/>
- Golinowski, W., Grundler, F. M. W., & Sobczak, M. (1996). Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Protoplasma*, 194(1–2), 103–116. <https://doi.org/10.1007/BF01273172>
- Gorny, A. M., Ye, W., Cude, S., & Thiessen, L. (2021). Soybean Root-Knot Nematode: A Diagnostic Guide. *Plant Health Progress*, 22(2), 164–175. <https://doi.org/10.1094/PHP-01-21-0005-DG>
- Grabau, Z. J., & Noling, J. W. (2019). Nematode management in potatoes (Irish or white). In ENI-029 Document, Entomology and Nematology Department, *UF/IFAS Extension*, University of Florida, 5, 1–12. <https://doi.org/10.32473/edis-ng029-2019>

- Grabski, A., & Burgess, R. (2001). Preparation of protein samples for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: Procedures and tips. *Novations*, 13, 10–12. http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/PAGE_SDS/NOVAGEN_Prep_Sample_PAGE_SDS.pdf
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). Polyacrylamide gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 12, 525–532. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot100412>
- Hesar, A. M., Mogadam, E. M., & Maafi, Z. T. (2012). Morphometrical and genetic diversity of *Meloidogyne javanica* isolates from the North East of Iran. *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 14 (1): 1–11. <https://revistaselectronicas.ujaen.es/index.php/jnms/article/view/794>
- Hirschmann, H. (1986). *Meloidogyne hispanica* n. sp. (Nematoda: *Meloidogynidae*), the “Seville Root-Knot Nematode”. *Journal of Nematology*, 18(4), 520–532. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618593/>
- HODDA, M. (2022). Phylum Nematoda: a classification, catalogue, and index of valid genera, with a census of valid species. *Zootaxa*, 5114(1), 1–289. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5114.1.1>
- Hunt, D. J., & Handoo, Z. A. (2009). Taxonomy, identification, and principal species. In N. Perry, M. Moens, & J. L. Starr (Eds.), *Root-Knot Nematodes* (pp. 55–97). CABI Publishing, Wallingford, UK. <https://doi.org/10.1079/9781845934927.0055>
- Inácio, M.L., Rusinque, L., Nóbrega, F., Maleita, C., & Abrantes, I. (2018). Nemátodes das galhas radiculares: uma ameaça à produção agrícola. *Vida Rural* (Março), 36–38.
- Inácio, M. L., Camacho, M. J., Serra, C., Cordevile, C., Cordeiro, L., & Andrade, E. (2020a). First report of the potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, on Potato in the Azores, Portugal. *Plant Disease*, 104(6), 1874–1874. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-19-1429-PDN>
- Inácio, M. L., Camacho, M. J., Serra, C., Cordevile, C., Cordeiro, L., & Andrade, E. (2020b). First Report of the Potato Cyst Nematode, *Globodera rostochiensis*, on Potato in the Azores, Portugal. *Plant Disease*, 104(6), 1874–1874. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-19-1429-PDN>
- Janssen, T., Karssen, G., Verhaeven, M., Coyne, D., & Bert, W. (2016). Mitochondrial coding genome analysis of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne*) supports haplotype based diagnostics and reveals evidence of recent reticulate evolution. *Scientific Reports*, 6(1), 22591. <https://doi.org/10.1038/srep22591>
- Jepson, S. B. (1987). Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species), 1st ed. *CABI Publishing: Wallingford, UK*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:83122209>
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M. L., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946–961. <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>

- Karssen, G., & Moens, M. (2006). Root-knot Nematodes. In R. N. Perry & M. Moens (Eds.), *Plant nematology* (pp. 59–90). CABI Publishing, Wallingford, UK. <https://doi.org/10.1079/9781845930561.0059>
- Khalil, M. S. (2017). The Parasitism of Root Knot Nematodes: A Mini review. *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources*, 5(3), 1–3. <https://doi.org/10.19080/ijesnr.2017.05.555664>
- Kofoed, C. A., & White, A. W. (1919). A new nematode infection of man. *Journal of the American Medical Association*, 72(8), 567–569. <https://doi.org/10.1001/jama.1919.02610080033010>
- Kokalis-Burelle, N., Rosskopf, E. N., Butler, D. M., Fennimore, S. A., & Holzinger, J. (2016). Evaluation of Steam and Soil Solarization for *Meloidogyne arenaria* Control in Florida Floriculture Crops. *Journal of Nematology*, 48(3), 183–192. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2017-026>
- Koppenhöfer, A. M., Grewal, P. S., & Fuzy, E. M. (2007). Differences in penetration routes and establishment rates of four entomopathogenic nematode species into four white grub species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3), 184–195. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.10.005>
- Lambert, K., & Bekal, S. (2002). Introduction to plant-parasitic nematodes. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2002-1218-01>
- Lilley, C. J., Atkinson, H. J., & Urwin, P. E. (2005). Molecular aspects of cyst nematodes. *Molecular Plant Pathology*, 6(6), 577–588. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00306.x>
- Lorenzen, S. (1994). *The Phylogenetic Systematics of Free living Nematodes (translation)*, In London: Ray Society. <http://lib.ugent.be/catalog/rug01:000340588>
- Macara, A. M. (1963). Aspetos sobre a importância dos nemátodos de interesse agrícola em Portugal e no Ultramar Português. *Agros*, 46 (6), 367–384.
- Maleita, C., Esteves, I., Cardoso, J. M. S., Cunha, M. J., Carneiro, R. M. D. G., & Abrantes, I. (2018). *Meloidogyne luci*, a new root-knot nematode parasitizing potato in Portugal. *Plant Pathology*, 67(2), 366–376. <https://doi.org/10.1111/ppa.12755>
- 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(4), 879–894. <https://doi.org/10.1111/nph.12323>
- Mitkowski, N. A., & Abawi, G. S. (2003). Root-knot nematodes. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2003-0917-01>
- Moens, M., Perry, R. N., & Starr, J. L. (2009). Root-Knot Nematodes. In R. N. Perry, M. Moens, & J. L. Starr (Eds.), *Root-Knot Nematodes* (pp. 1–17). In CABI Publishing, Wallingford, UK. <https://doi.org/10.1079/9781845934927.0001>
- Morais, M. P. P., Kassaar, O., Flower, S. E., Williams, R. J., James, T. D., & van den Elsen, J. M. H. (2019). Analysis of protein glycation using phenylboronate acrylamide gel electrophoresis. In B. Kurien & R. Scofield (Eds.), *Electrophoretic Separation of*

- Proteins. Methods in Molecular Biology*, 1855, 161–175. In Humana Press, New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_16
- Naz, I., Palomares-Rius, J. E., Blok, V., Saifullah, Ali, S., & Ahmed, M. (2012). Prevalence, incidence, and molecular identification of root-knot nematodes of tomato in Pakistan. *African Journal of Biotechnology*, 11, 16547–16556. <https://doi.org/10.5897/AJB12.2502>
- Neal, J. C. (1889). The root-knot disease of the peach, orange, and other plants in Florida, due to the work of anguillula. Bulletin 20, Division of Entomology, US Department of Agriculture, Washington, DC, USA. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.109938>
- Ochola, J., Coyne, D., Cortada, L., Haukeland, S., Ng'ang'a, M., Hassanali, A., Opperman, C., & Torto, B. (2021). Cyst nematode bio-communication with plants: implications for novel management approaches. *Pest Management Science*, 77(3), 1150–1159. <https://doi.org/10.1002/ps.6105>
- Oka, Y., Shapira, N., & Fine, P. (2007). Control of root-knot nematodes in organic farming systems by organic amendments and soil solarization. *Crop Protection*, 26(10), 1556–1565. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.01.003>
- Olsen, M. W. (2000). Root-knot Nematodes. *The University of Arizona Cooperative Extension*. <https://extension.arizona.edu/sites/extension.arizona.edu/files/pubs/az1187.pdf>
- Onkendi, E. M., Kariuki, G. M., Marais, M., & Moleleki, L. N. (2014). The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: a review. In <https://doi.org/10.1111/ppa.12202> (consultado 22.09.2023).
- Orlando, V., & Boa, E. (2023). Potato cyst nematodes: A persistent and fearsome foe. In *Plant Pathology*, 1–16. <https://doi.org/10.1111/ppa.13779>
- Perry, R., Moens, M., & Starr, J. L. (eds.). (2009). *Root-knot Nematodes*. In CABI Publishing, Wallingford, UK, 531 pp.
- Perry, R. N. (2018). *Cyst nematodes* (R. N. Perry, M. Moens, & J. T. Jones, Eds.). In CABI Publishing, Wallingford, UK, 441 pp.
- Phan, K. L., LE, T. M. L., Nguyen, H. T., Nguyen, T. D., & Trinh, Q. P. (2021). First report and new molecular and morphological characterizations of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, infecting ginger and long coriander in Vietnam. *Journal of Nematology*, 53(1), 1–8. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2021-011>
- Price, J. A., Coyne, D., Blok, V. C., & Jones, J. T. (2021). Potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Molecular Plant Pathology*, 22(5), 495–507. <https://doi.org/10.1111/mpp.13047>
- Priya, D. B., Somasekhar, N., Prasad, J. S., & Kirti, P. B. (2011). Transgenic tobacco plants constitutively expressing Arabidopsis NPR1 show enhanced resistance to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *BMC Research Notes*, 4(1), 2–5. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-231>

- Qin, L., Kudla, U., Roze, E. H. A., Goverse, A., Popeijus, H., Nieuwland, J., Overmars, H., Jones, J. T., Schots, A., Smant, G., Bakker, J., & Helder, J. (2004). A nematode expansin acting on plants. *Nature*, 427(6969), 30–30. <https://doi.org/10.1038/427030a>
- Rahman, L. (2003). *Root knot disease and its control*. In *Agfact* AB.1, 1-10. https://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0004/177358/root-knot-disease.pdf (consultado a 13-09.2023).
- Riascos, D., Mosquera-Espinosa, A., Varon, F., Rosa, J., Oliveira, C., & Muñoz, J. (2020). Morphological, Biochemical, and molecular diagnostics of *Meloidogyne* spp. associated with *Musa* spp. in Colombia. *Nematropica*, 49, 229–245.
- Riga, E., Perry, R. N., Barrett, J., & Johnston, M. R. L. (1996). Electrophysiological responses of males of the potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*, to their sex pheromones. *Parasitology*, 112(2), 239–246. <https://doi.org/10.1017/S0031182000084821>
- Roselino, A. M. (2008). Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais. In *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 83(3), 187–203. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962008000300002>
- Rowe, J. (2022a). *Globodera pallida* (white potato cyst nematode). In *CABI Compendium*, *CABI Compendium*. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.27033>
- Rowe, J. (2022b). *Globodera rostochiensis* (yellow potato cyst nematode). In *CABI Compendium*. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.27034>
- Rusique, L., Camacho, M. J., Serra, C., Nóbrega, F., & Inácio, M. L. (2023). Root-knot nematode assessment: species identification, distribution, and new host records in Portugal. In *Frontiers in Plant Science*, 14, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1230968>
- Rusique, L., Inácio, M. L., Mota, M., & Nóbrega, F. (2018). Morphological, biochemical, and molecular characterisation of *Meloidogyne javanica*, from North Portugal, in tomato. *Revista de Ciências Agrárias* 41(1). <https://doi.org/10.19084/RCA17078>
- Rusique, L., Nóbrega, F., Cordeiro, L., Lima, A., Andrade, S., & Inácio, M. L. (2022). Root-knot nematode species associated with horticultural crops in the island of Azores, Portugal. *Horticulturae*, 8(2), 1–9. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8020101>
- Rusique, L., Nóbrega, F., Cordeiro, L., Serra, C., & Inácio, M. L. (2021). First detection of *Meloidogyne luci* (Nematoda: Meloidogynidae) parasitizing potato in the Azores, Portugal. *Plants* 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.3390/plants10010099>
- Rusique, L., Nóbrega, F., Serra, C., & Inácio, M. L. (2022). The northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla*: New Host Records in Portugal. *Biology* 11(11), 1567. <https://doi.org/10.3390/biology11111567>
- Santos, C. E. C., Cordovil, C. da C. V. C., & Mota, J. A. R. (2010). Prospecção de nemátodos fitoparasitas nos Açores 2006-2009. Direcção dos Serviços de Agricultura e Pecuária: Laboratório Regional de Sanidade Vegetal, Ponta Delgada, Açores.

- Santos, D., Correia, A., Abrantes, I., & Maleita, C. (2019). New hosts and records in Portugal for the Root-Knot Nematode *Meloidogyne luci*. *Journal of Nematology*, 51(1), 1–4. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2019-003>
- Sasanelli, N., Konrat, A., Migunova, V., Toderas, I., Iurcu-Straistaru, E., Rusu, S., Bivol, A., Andoni, C., & Veronico, P. (2021). Review on control methods against plant parasitic nematodes applied in southern member states (C Zone) of the European Union. *Agriculture*, 11, 602. *Plants*, 10(2), 389. <https://doi.org/10.3390/plants10020389>
- Saucet, S. B., Van Ghelder, C., Abad, P., Duval, H., & Esmenjaud, D. (2016). Resistance to root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. in woody plants. *New Phytologist*, 211(1), 41–56. <https://doi.org/10.1111/nph.13933>
- Secretaria Regional da Agricultura e do Desenvolvimento Rural, & Direção Regional de Agricultura. (2021). *Relatório de Atividades*. [file:///C:/Users/sami/Downloads/relatorio-dsa-2020-1%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/sami/Downloads/relatorio-dsa-2020-1%20(2).pdf)
- 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(9), 995–1009. <https://doi.org/10.1163/15685411-00002935>
- Sikora, R. A., Coyne, D., Hallmann, J., & Timper, P. (2018). In R. A. Sikora, D. Coyne, J. Hallmann & P. Timper (Eds.), *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (3rd ed.). CABI Publishing, Wallingford, UK. 852 pp.
- Silva, J. C. P., Terra, W., Freire, E. S., Campos, V., & Castro, J. M. da C. (2014). Aspectos gerais do manejo de *Meloidogyne enterolobii* (Nefit). *Suprema*. https://www.researchgate.net/publication/320871441_ASPECTOS_GERAIS_E_MANEJO_DE_Meloidogyne_enterolobii (consultado a 13-09. 2023)
- Singh, R., & Phulera, S. (2015). Plant Parasitic Nematodes: The Hidden Enemies of Farmers In Somesh Yadav & Rajendra Singh (Eds.), *Environmental Issues for Socio-ecological Development* (pp. 68-81).
- Sobczak, M., & Golinowski, W. (2011). Cyst Nematodes and Syncytia. In J. Jones, G. Gheysen, & C. Fenoll (Eds.), *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions* (pp. 61–82). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3_4
- Song, M., Li, X., Jing, S., Lei, L., Wang, J., & Wan, S. (2016). Responses of soil nematodes to water and nitrogen additions in an old-field grassland. *Applied Soil Ecology*, 102, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.02.011>
- Steward, K. (2022). *Polyacrylamide Gel Electrophoresis, How It Works, Technique Variants and Its Applications*. <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/polyacrylamide-gel-electrophoresis-how-it-works-technique-variants-and-its-applications-359100> (consultado em 07.08.2023)
- Subedi, S., Thapa, B., & Shrestha, J. (2020). Root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and its management: a review. *Journal of Agriculture and Natural Resources*, 3(2), 21–31. <https://doi.org/10.3126/janr.v3i2.32298>

- Sullivan, M. J., Inserra, R. N., Franco, J., Moreno-Leheude, I., & Greco, N. M. (2007). Potato Cyst Nematodes: plant host status and their regulatory impact. *Nematropica*, 37, 193–202. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:86176588>
- Torto, B., Cortada, L., Murungi, L. K., Haukeland, S., & Coyne, D. L. (2018). Management of Cyst and Root Knot Nematodes: A Chemical Ecology Perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(33), 8672–8678. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01940>
- Treub, M. (1885). *Onderzoekingen over Sereh-Ziek Suikkeriet gedaan in s Lands Plantentium te Buitenzorg* (Vol. 2). In Landsdrukkerij. 39 pp. (v. digital 14.09.2016)
- Trudgill, D. L. (1997). Parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.); how can these biotrophic endoparasites have such an enormous host range? *Plant Pathology*, 46(1), 26–32. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1997.d01-201.x>
- Vieira, P., & Gleason, C. (2019). Plant-parasitic nematode effectors — insights into their diversity and new tools for their identification. *Current Opinion in Plant Biology*, 50, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.007>
- Wainer, J., & Dinh, Q. (2021). Taxonomy, Morphological and Molecular Identification of the Potato Cyst Nematodes, *Globodera pallida* and *G. rostochiensis*. *Plants*, 10(1), 1–21. <https://doi.org/10.3390/plants10010184>
- Warmerdam, S. (2019). Susceptibility genes, a novel strategy to improve resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Internal PhD, WU, Wageningen University*, 82 pp. <https://doi.org/10.18174/470461>
- Wendimu, G. Y. (2021). Biology, Taxonomy, and Management of the Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) in Sweet Potato. *Advances in Agriculture*, 2021, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2021/8820211>
- Yang, B., & Eisenback, J. D. (1983). *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (*Meloidogynidae*), a Root-knot Nematode Parasitizing Pacara Earpod Tree in China. *Journal of Nematology*, 15(3), 381–391. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618283/>
- Yang, P. C., & Mahmood, T. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Ye, W., Robbins, R. T., & Kirkpatrick, T. (2019). Molecular characterization of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from Arkansas, USA. *Scientific Reports*, 9(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52118-4>

VII. Anexos

Anexo 1

Quadro 15- Deteção de *Meloidogyne* spp. em amostras de 400 gramas, de solos hortícolas do município de Ponta Delgada (Quadro completo)

Coordenadas (°,min,s, E)	Local (Concelho)	Nº Amostra	Local (Freguesia)	Número de Juvenis (J2) <i>Meloidogyne</i> sp.
37° 45' 17.906" N 25° 37' 43.507" W	Ponta Delgada	1	São Roque	5
		2	São Roque	21
		3	São Roque	16
		4	São Roque	0
		5	São Roque	3
		6	São Roque	2
37° 45' 23.306" N 25° 37' 58.962" W		7	São Roque	26
		8	São Roque	23
		9	São Roque	44
		10	São Roque	33
37° 46' 21.846" N 25° 37' 25.018" W		11	São Roque	5
		12	São Roque	25
		13	São Roque	8
		14	São Roque	9
37° 45' 53.100" N 25° 35' 27.100" W		39	Livramento	45
		40	Livramento	11
		41	Livramento	0
		42	Livramento	5
		43	Livramento	9
37° 45' 26.647" N 25° 41' 47.965" W		44	Livramento	2
	45	Arrifes	35	
	46	Arrifes	5	
	47	Arrifes	258	
	48	Arrifes	9	
	49	Arrifes	4	
	50	Arrifes	2	
	51	São Pedro	3	
	52	São Pedro	1	
	37° 50' 24.565" N 25° 49' 58.649" W	53	Ginetes	0
54		Ginetes	0	
55		Ginetes	9	
56		Ginetes	15	
57		Ginetes	0	
37° 50' 19.943" N 25° 50' 2.742" W	58	Ginetes	0	
37° 50' 17.685" N 25° 50' 32.781" W	65	Ginetes	1	
37° 50' 38.130" N 25° 50' 45.420" W	66	Ginetes	9	
	67	Ginetes	18	
37° 50' 23.730" N 25° 50' 36.240" W	68	Ginetes	2	
37° 53' 18.427" N 25° 48' 49.597" W	69	Mosteiros	2	

Anexo 2

Quadro 16 - Detecção de *Meloidogyne* spp. em amostras de 400 gramas, de solos hortícolas do município de Ribeira Grande (Quadro completo)

Coordenadas (°,min,s,⊙)	Local (Concelho)	Nº Amostra	Local (Freguesia)	Número de Juvenis (J2) <i>Meloidogyne</i> sp.
37° 48' 16.643" N 25° 35' 31.848" W	Ribeira Grande	15	Rabo de Peixe	24
		16	Rabo de Peixe	1
		17	Rabo de Peixe	5
		18	Rabo de Peixe	2
37° 45' 26.647" N 25° 41' 47.965" W		23	Rabo de Peixe	2
		24	Rabo de Peixe	0
		25	Rabo de Peixe	0
37° 45' 42.534" N 25° 40' 45.588" W		26	Rabo de Peixe	1
		31	Rabo de Peixe	57
		32	Rabo de Peixe	12
		63	Rabo de Peixe	6
37° 48' 4.025" N 25° 34' 32.610" W		64	Rabo de Peixe	3
		82	Rabo de Peixe	1
37° 49' 1.074" N 25° 35' 57.127" W		27	Calhetas	3
		28	Calhetas	0
		29	Calhetas	0
		30	Calhetas	35
37° 48' 28.440" N 25° 37' 26.627" W		19	Pico da Pedra	4
		20	Pico da Pedra	0
		21	Pico da Pedra	0
	22	Pico da Pedra	1	
37° 48' 31.497" N 25° 37' 17.697" W	81	Pico da Pedra	1	
37° 48' 27.552" N 25° 32' 43.628" W	70	Ribeira Seca	0	
37° 48' 26.508" N 25° 33' 9.157" W	71	Ribeira Seca	0	
37° 48' 55.726" N 25° 32' 28.629" W	72	Ribeira Seca	0	
37° 48' 43.950" N 25° 33' 6.360" W	73	Ribeira Seca	3	
37° 48' 13.677" N 25° 32' 23.734" W	74	Ribeira Seca	0	
37° 48' 19.435" N 25° 32' 11.068" W	75	Ribeira Seca	1	
37° 48' 30.272" N 25° 33' 1.325" W	76	Ribeira Seca	0	
37° 48' 29.512" N 25° 32' 51.914" W	77	Ribeira Seca	1	
37° 48' 27.947" N 25° 33' 10.786" W	78	Ribeira Seca	1	
37° 48' 25.136" N 25° 33' 11.659" W	79	Ribeira Seca	1	

37° 49' 13.350" N 25° 29' 47.432" W	Ribeira Grande	83	Ribeirinha	86
37° 50' 40.052" N 25° 20' 6.828" W		84	Fenais da Ajuda	0
37° 50' 52.915" N 25° 19' 18.606" W		85	Fenais da Ajuda	4
37° 50' 54.564" N 25° 19' 19.621" W		86	Fenais da Ajuda	0
37° 51' 17.046" N 25° 19' 18.772" W		87	Fenais da Ajuda	57
37° 50' 49.841" N 25° 20' 10.036" W		88	Fenais da Ajuda	0
37° 51' 45.767" N 25° 19' 3.911" W		89	Fenais da Ajuda	487
37° 51' 27.194" N 25° 18' 52.798" W		90	Lomba de São Pedro	69
37° 50' 57.692" N 25° 18' 40.687" W		91	Lomba de São Pedro	0
37° 50' 44.171" N 25° 18' 39.139" W		92	Lomba de São Pedro	0
37° 50' 41.662" N 25° 18' 52.787" W		93	Lomba de São Pedro	0
37° 50' 10.604" N 25° 19' 25.230" W		94	Lomba de São Pedro	0

Anexo 3

Quadro 17 - Resultado dos Biotestes das amostras do município de Ponta Delgada

Coordenadas (°,min,s,⊙)	Local (Concelho)	Nº Amostra	Local (Freguesia)	Resultado Bioteste <i>Meloidogyne</i> spp.	Data de Início dos Biotestes	Data de Fim dos Biotestes
37° 45' 17.906" N 25° 37' 43.507" W	Ponta Delgada	1	São Roque	Positivo	17/02/2021	19/04/2021
		2	São Roque	Positivo	19/02/2021	21/04/2021
		3	São Roque	Positivo	19/02/2021	21/04/2021
		4	São Roque	Não Efetuado		
		5	São Roque	Positivo	25/02/2021	26/04/2021
		6	São Roque	Positivo	25/02/2021	26/04/2021
37° 45' 23.306" N 25° 37' 58.962" W		7	São Roque	Negativo	25/02/2021	26/04/2021
		8	São Roque	Positivo	02/03/2021	03/05/2021
		9	São Roque	Positivo	02/03/2021	03/05/2021
37° 46' 21.846" N 25° 37' 25.018" W		10	São Roque	Negativo	04/03/2021	05/05/2021
		11	São Roque	Positivo	04/03/2021	05/05/2021
		12	São Roque	Positivo	05/03/2021	06/05/2021
		13	São Roque	Inconclusivo	25/03/2021	25/05/2021
37° 45' 53.100" N 25° 35' 27.100" W		14	São Roque	Inconclusivo	25/03/2021	25/05/2021
		39	Livramento	Positivo	16/04/2021	15/06/2021
		40	Livramento	Positivo	16/04/2021	15/06/2021
		41	Livramento	Não Efetuado		
		42	Livramento	Negativo	16/04/2021	15/06/2021
37° 45' 26.647" N 25° 41' 47.965" W		43	Livramento	Negativo	16/04/2021	15/06/2021
		44	Livramento	Negativo	16/04/2021	15/06/2021
37° 45' 42.534" N 25° 40' 45.588" W		45	Arrifes	Positivo	16/04/2021	15/06/2021
		46	Arrifes	Inconclusivo	16/04/2021	15/06/2021
		47	Arrifes	Inconclusivo	16/04/2021	15/06/2021
		48	Arrifes	Positivo	16/04/2021	15/06/2021
37° 45' 31.730" N 25° 40' 34.838" W		49	Arrifes	Negativo	16/04/2021	15/06/2021
		50	Arrifes	Negativo	16/04/2021	15/06/2021
37° 45' 12.658" N 25° 39' 54.464" W		51	São Pedro	Negativo	16/04/2021	15/06/2021
		52	São Pedro	Positivo	16/04/2021	15/06/2021
37° 50' 24.565" N 25° 49' 58.649" W		53	Gínetes	Não Efetuado		
		54	Gínetes	Não Efetuado		
		55	Gínetes	Inconclusivo	28/04/2021	28/06/2021
		56	Gínetes	Inconclusivo	28/04/2021	28/06/2021
		57	Gínetes	Não Efetuado		
37° 50' 19.943" N 25° 50' 2.742" W		58	Gínetes	Negativo	28/04/2021	28/06/2021
37° 50' 17.685" N 25° 50' 32.781" W		65	Gínetes	Negativo	28/04/2021	28/06/2021
		66	Gínetes	Inconclusivo	28/04/2021	28/06/2021
37° 50' 38.130" N 25° 50' 45.420" W		67	Gínetes	Inconclusivo	28/04/2021	28/06/2021
		68	Gínetes	Inconclusivo	28/04/2021	28/06/2021
37° 50' 23.730" N 25° 50' 36.240" W		69	Mosteiros	Positivo	28/04/2021	28/06/2021
		37° 53' 18.427" N 25° 48' 49.597" W				

Anexo 4


Quadro 18 - Resultado dos Biotestes das amostras do município da Ribeira Grande

Coordenadas (°,min,s,⊙)	Local (Concelho)	Nº Amostra	Local (Freguesia)	Resultado Bioteste <i>Meloidogyne</i> spp.	Data de Início dos Biotestes	Data de Fim dos Biotestes
37° 48' 16.643" N 25° 35' 31.848" W	Ribeira Grande	15	Rabo de Peixe	Inconclusivo	25/03/2021	25/05/2021
		16	Rabo de Peixe	Negativo	25/03/2021	25/05/2021
		17	Rabo de Peixe	Positivo	29/03/2021	28/05/2021
		18	Rabo de Peixe	Negativo	29/03/2021	28/05/2021
37° 45' 26.647" N 25° 41' 47.965" W		23	Rabo de Peixe	Positivo	29/03/2021	28/05/2021
		24	Rabo de Peixe	Não Efetuado		
		25	Rabo de Peixe	Não Efetuado		
37° 45' 42.534" N 25° 40' 45.588" W		26	Rabo de Peixe	Negativo	29/03/2021	28/05/2021
		31	Rabo de Peixe	Positivo	29/03/2021	28/05/2021
		32	Rabo de Peixe	Positivo	29/03/2021	28/05/2021
		63	Rabo de Peixe	Inconclusivo	28/04/2021	28/06/2021
37° 48' 4.025" N 25° 34' 32.610" W		64	Rabo de Peixe	Inconclusivo	28/04/2021	28/06/2021
		82	Rabo de Peixe	Negativo	11/11/2021	10/01/2021
37° 49' 1.074" N 25° 35' 57.127" W		27	Calhetas	Negativo	29/03/2021	28/05/2021
		28	Calhetas	Não Efetuado		
		29	Calhetas	Não Efetuado		
		30	Calhetas	Positivo	29/03/2021	28/05/2021
37° 48' 28.440" N 25° 37' 26.627" W		19	Pico da Pedra	Positivo	29/03/2021	28/05/2021
		20	Pico da Pedra	Não Efetuado		
		21	Pico da Pedra	Não Efetuado		
	22	Pico da Pedra	Negativo	29/03/2021	28/05/2021	
37° 48' 31.497" N 25° 37' 17.697" W	81	Pico da Pedra	Negativo	11/11/2021	10/01/2021	
37° 48' 27.552" N 25° 32' 43.628" W	70	Ribeira Seca	Não Efetuado			
37° 48' 26.508" N 25° 33' 9.157" W	71	Ribeira Seca	Não Efetuado			
37° 48' 55.726" N 25° 32' 28.629" W	72	Ribeira Seca	Não Efetuado			
37° 48' 43.950" N 25° 33' 6.360" W	73	Ribeira Seca	Inconclusivo	28/04/2021	28/06/2021	
37° 48' 13.677" N 25° 32' 23.734" W	74	Ribeira Seca	Não Efetuado			
37° 48' 19.435" N 25° 32' 11.068" W	75	Ribeira Seca	Inconclusivo	28/04/2021	28/06/2021	
37° 48' 30.272" N 25° 33' 1.325" W	76	Ribeira Seca	Não Efetuado			
37° 48' 29.512" N 25° 32' 51.914" W	77	Ribeira Seca	Inconclusivo	28/04/2021	28/06/2021	
37° 48' 27.947" N 25° 33' 10.786" W	78	Ribeira Seca	Inconclusivo	31/05/2021	02/08/2021	
37° 48' 25.136" N 25° 33' 11.659" W	79	Ribeira Seca	Inconclusivo	28/04/2021	28/06/2021	

37° 49' 13.350" N 25° 29' 47.432" W	Ribeira Grande	83	Ribeirinha	Positivo	11/11/2021	10/01/2021
37° 50' 40.052" N 25° 20' 6.828" W		84	Fenais da Ajuda	Não Efetuado		
37° 50' 52.915" N 25° 19' 18.606" W		85	Fenais da Ajuda	Negativo	11/11/2021	10/01/2021
37° 50' 54.564" N 25° 19' 19.621" W		86	Fenais da Ajuda	Não Efetuado		
37° 51' 17.046" N 25° 19' 18.772" W		87	Fenais da Ajuda	Positivo	11/11/2021	10/01/2021
37° 50' 49.841" N 25° 20' 10.036" W		88	Fenais da Ajuda	Não Efetuado		
37° 51' 45.767" N 25° 19' 3.911" W		89	Fenais da Ajuda	Positivo	11/11/2021	10/01/2021
37° 51' 27.194" N 25° 18' 52.798" W		90	Lomba de São Pedro	Negativo	11/11/2021	10/01/2021
37° 50' 57.692" N 25° 18' 40.687" W		91	Lomba de São Pedro	Não Efetuado		
37° 50' 44.171" N 25° 18' 39.139" W		92	Lomba de São Pedro	Não Efetuado		
37° 50' 41.662" N 25° 18' 52.787" W		93	Lomba de São Pedro	Não Efetuado		
37° 50' 10.604" N 25° 19' 25.230" W		94	Lomba de São Pedro	Não Efetuado		

Anexo 5

Quadro 19 - Resultados da identificação das espécies de *Meloidogyne* das amostras com bioteste positivo

Coordenadas (°,min,s, )	Local (Concelho)	Nº Amostra	Local (Freguesia)	Resultado Bioteste <i>Meloidogyne</i> spp.	Espécie de <i>Meloidogyne</i>
37° 45' 17.906" N 25° 37' 43.507" W	Ponta Delgada	1	São Roque	Positivo	Meloidogyne incognita
		2	São Roque	Positivo	Meloidogyne incognita
		3	São Roque	Positivo	Meloidogyne incognita
		5	São Roque	Positivo	ND
		6	São Roque	Positivo	Meloidogyne incognita
37° 45' 23.306" N 25° 37' 58.962" W		8	São Roque	Positivo	Meloidogyne incognita
		9	São Roque	Positivo	Meloidogyne javanica
37° 46' 21.846" N 25° 37' 25.018" W		11	São Roque	Positivo	Meloidogyne incognita
		12	São Roque	Positivo	Meloidogyne incognita
37° 45' 53.100" N 25° 35' 27.100" W		39	Livramento	Positivo	Meloidogyne incognita
		40	Livramento	Positivo	Meloidogyne incognita
37° 45' 26.647" N 37° 45' 42.534" N		45	Arrifes	Positivo	Meloidogyne incognita
		48	Arrifes	Positivo	Meloidogyne javanica
37° 45' 12.658" N		52	São Pedro	Positivo	ND
37° 53' 18.427" N 25° 48' 49.597" W		69	Mosteiros	Positivo	Meloidogyne incognita
	Ribeira Grande	17	Rabo de Peixe	Positivo	Meloidogyne incognita
23		Rabo de Peixe	Positivo	Meloidogyne arenaria	
31		Rabo de Peixe	Positivo	Meloidogyne arenaria	
37° 45' 42.534" N 25° 40' 45.588" W		32	Rabo de Peixe	Positivo	ND
		30	Calhetas	Positivo	ND
37° 48' 28.440" N		19	Pico da Pedra	Positivo	ND
37° 49' 13.350" N 25° 29' 47.432" W		83	Ribeirinha	Positivo	ND
	Ribeira Grande	87	Fenais da Ajuda	Positivo	ND
		89	Fenais da Ajuda	Positivo	ND
37° 51' 17.046" N 25° 19' 18.772" W	Lagoa	33	Água de Pau	Positivo	Meloidogyne incognita
		35	Santa Cruz	Positivo	Meloidogyne incognita
		36	Santa Cruz	Positivo	Meloidogyne incognita
37° 43' 4.717" N 25° 29' 35.569" W	Vila Franca	38	Ribeira Seca	Positivo	Meloidogyne incognita
37° 51' 9.349" N 25° 17' 32.626" W	Nordeste	95	Achadinha	Positivo	ND
		100	Santo Antonio Nordestino	Positivo	ND
37° 51' 14.227" N 25° 12' 27.342" W	Povoação	102	Vila da Povoação	Positivo	ND
		37° 44' 51.922" N 25° 15' 52.858" W	104	Nossa Senhora dos Remédios	Positivo
37° 45' 35.647" N 25° 14' 11.785" W			105	Nossa Senhora dos Remédios	Positivo
		37° 44' 57.588" N 25° 15' 33.660" W			