



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA E FISIOLÓGICA DE POPULAÇÕES DE**  
***Meloidogyne incognita* E IDENTIFICAÇÃO DE QTLs**  
**DE UMA NOVA FONTE DE RESISTÊNCIA DO ALGODOEIRO (*Gossypium***  
**spp.) A ESSE NEMATOIDE**

**ESDRAS HENRIQUE DA SILVA**

**Brasília – DF**

**2014**

**ESDRAS HENRIQUE DA SILVA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA E FISIOLÓGICA DE POPULAÇÕES DE  
*Meloidogyne incognita* E IDENTIFICAÇÃO DE QTLs  
DE UMA NOVA FONTE DE RESISTÊNCIA DO ALGODOEIRO (*Gossypium*  
*spp.*) A ESSE NEMATOIDE**

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

**Orientador**

Prof. Dr. Cleber Furlanetto

**Co-orientador**

Dra. Regina M. D. G. Carneiro

**BRASÍLIA  
DISTRITO FEDERAL - BRASIL**

**2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Esdras Henrique.

Variabilidade genética e fisiológica de populações de *Meloidogyne incognita* e identificação de QTLs de uma nova fonte de resistência do algodoeiro (*Gossypium* spp.) a esse nematoide. / Esdras Henrique da Silva

Brasília, 2014.

Número de páginas p.: 162

Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília-DF

I. Fitopatologia – Nematologia

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Variabilidade genética e fisiológica de populações de *Meloidogyne incognita* e identificação de QTLs de uma nova fonte de resistência do algodoeiro (*Gossypium* spp.) a esse nematoide.

Aos meus pais, Mauricio e Leida, a  
minha irmã, Mariana, ao meu cunhado  
Alan e a minha sobrinha Alicia.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois acredito em sua existência, e sei que ele me proporcionou saúde, determinação e força para alcançar esta conquista. Aos meus pais, minha irmã, meu cunhado e minha sobrinha, que são minha família e sempre me deram apoio para continuar a caminhada.

Às pessoas que me ajudaram a alcançar meus objetivos, deste o início, quando me matriculei no curso Técnico em Agropecuária, na cidade de Colatina-ES. Meus tios e tias, em especial aos tios Francisco, Edilton e Hélio, e as tias Helena, Creuza e Gracenilda. Aos meus antigos vizinhos Cleber e Lúcia, juntamente com seus três filhos, que sempre estiveram prontos a me ajudar nas caronas e nas estadias em sua casa.

Aos meus orientadores, professor Dr. Cleber Furlanetto e Dra. Regina Carneiro, o meu agradecimento por me proporcionar condições de obter o título de Doutor. Aos pesquisadores da Embrapa Cenargen Dr. Márcio Moretzsohn e a Dr. Vânia Azevedo, agradeço por ter disponibilizado a estrutura do laboratório de Genética Vegetal, para realizar parte do trabalho. À Dra. Regina Carneiro, agradeço pela ajuda e pela sua disponibilidade, e por ter aceitado desempenhar o projeto desta tese em parceira com a UnB.

Ao Dr. Marc Giband (CIRAD, França) e ao Dr. Paulo Barroso (Embrapa Algodão) agradeço por disponibilizar as sementes dos acessos testados, além da valiosa contribuição no aprimoramento deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Nematologia: Fabiane, Vanessa, Joelma, Marcilene, Mariana, Fábio, Aldemiro, os quais compartilharam as minhas angústias e alegrias, agradeço pelas palavras de apoio.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília e a Embrapa Cenargen, pela oportunidade. Aos professores e pesquisadores, pelos valiosos ensinamentos e dedicação, à funcionária do Laboratório de Genética Vegetal, Lorena, por todo suporte, e ao Ribamar, pela ajuda e instruções nas questões burocráticas. Ao CNPq pela bolsa de Doutorado que me proporcionou os recursos financeiros necessários durante o curso.

Agradeço aos meus amigos de trabalho, Pedro Peixoto, Paulo Maestrello e Luiz Ferreira, pelo apoio, incentivo e respeito, os quais tornam o ambiente de trabalho um local alegre e saudável.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Dr. Cleber Furlanetto** e co-orientação da **Dra. Regina M.D.G. Carneiro**, com apoio institucional da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Variabilidade genética e fisiológica de populações de *Meloidogyne incognita* e identificação de QTLs de uma nova fonte de resistência do algodoeiro (*Gossypium* spp.) a esse nematoide**

**ESDRAS HENRIQUE DA SILVA**

TESE APROVADA em \_\_/\_\_/\_\_\_\_ por:

---

Professor, Ph. D. Juvenil Enrique Cares (Universidade de Brasília)  
Examinador Interno

---

Pesquisadora, Ph. D. Maria Esther Boiteux (Embrapa Hortaliças)  
Examinador Externo

---

Professor, Ph. D. Robert Neil Gerard Miller (Universidade de Brasília)  
Examinador Interno

---

Pesquisador, Dr. Márcio de Carvalho Moretzsohn (Embrapa Cenargen)  
Examinador Externo

---

Professor, Ph. D. Cleber Furlanetto (Universidade de Brasília)  
Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL

BRASIL

**2014**

## SUMÁRIO

	Página
Lista de tabelas.....	i
Lista de figuras.....	ii
Resumo geral.....	iv
General abstract.....	vi
Introdução geral.....	1
Objetivo geral.....	4
Objetivos específicos.....	4
<b>CAPÍTULO 1: Revisão de literatura.....</b>	<b>5</b>
1. A cultura do algodoeiro.....	6
2. Produção mundial de algodão.....	9
3. Nematoides parasitas do algodoeiro.....	10
4. Classificação do gênero <i>Meloidogyne</i> .....	11
5. Ciclo de vida e comportamento de <i>Meloidogyne</i> spp.....	12
6. Diversidade do gênero <i>Meloidogyne</i> e o uso de marcadores moleculares para o seu estudo.....	15
7. Melhoramento genético de planta por meio de ferramentas moleculares.....	20
8. Mapeamento genético e mapeamento de QTLs.....	25
9. Mapas genéticos em <i>Gossypium</i> spp.....	29
10. Mapeamento de QTLs em <i>Gossypium</i> .....	31
11. Nematóide das galhas: virulência e patogenicidade.....	33
12. Cultivares de algodoeiros resistentes ao nematóide das galhas.....	34
13. Literatura citada.....	39
<b>CAPÍTULO 2: Variabilidade genética e virulência de populações de <i>Meloidogyne incognita</i> a genótipos resistentes de algodoeiro (<i>Gossypium</i> ssp.).....</b>	<b>58</b>
Resumo.....	59
Abstract.....	60
1. Introdução.....	61
2. Material e métodos.....	63
2.1. Identificação de espécies e raças do nematóide.....	63
2.2. Extração de ovos e preparação de DNA.....	64
2.3. Técnica PCR-RAPD.....	66
2.4. Técnica PCR-ISSR.....	67
2.5. Técnica PCR-AFLP.....	67
2.6. Análises de polimorfismo.....	68
2.7. Genótipos de <i>Gossypium</i> .....	69
2.8. Inóculo do nematóide.....	71
2.9. Avaliação de resistência ao nematóide.....	71
3. Resultados.....	72
4. Discussão.....	78

5. Literatura citada .....	82
<b>CAPÍTULO 3: Identificação de QTLs ligados à resistência a <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3 em um cruzamento de <i>Gossypium hirsutum</i> X <i>Gossypium barbadense</i> .....</b>	<b>89</b>
Resumo.....	90
Abstract.....	92
1. Introdução.....	93
2. Material e métodos.....	95
2.1. Material vegetal.....	95
2.2. Extração de DNA e PCR dos locos microssatélites.....	96
2.3. Construção do mapa.....	98
2.4. Avaliação fenotípica.....	99
2.5. Análises de QTLs.....	100
3. Resultados .....	101
4. Discussão .....	115
5. Literatura citada .....	121
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>128</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>129</b>

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>CAPÍTULO 1:</b> Revisão de literatura	
<b>Tabela 1.</b> Teste para determinação de raças de <i>Meloidogyne incognita</i> em plantas hospedeiras diferenciadoras, segundo Taylor & Sasser (1978).....	14
<b>CAPÍTULO 2:</b> Variabilidade genética e virulência de populações de <i>Meloidogyne incognita</i> a genótipos resistentes de algodoeiro ( <i>Gossypium</i> spp.)	
<b>Tabela 1.</b> Populações de <i>Meloidogyne</i> spp. de diferentes regiões do Brasil utilizadas no estudo.....	64
<b>Tabela 2.</b> Descrição dos acessos de <i>Gossypium</i> spp. utilizados no estudo.....	70
<b>Tabela 3.</b> Fatores de reprodução (FR) apresentados pelas cinco populações de <i>Meloidogyne incognita</i> raças 3 e 4 em acessos de algodoeiro selecionado.....	77
<b>Tabela 4.</b> Médias dos índices de galhas (IG) e massas de ovos (IMO) de cinco populações de <i>Meloidogyne incognita</i> raças 3 e 4 em acessos de algodoeiro selecionados.....	78
<b>CAPÍTULO 3:</b> Identificação de qtls ligados à resistência a <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3 em um cruzamento de <i>Gossypium hirsutum</i> X <i>Gossypium barbadense</i> .	
<b>Tabela 1.</b> Características do mapa genético obtido do cruzamento de algodoeiro FM966 ( <i>G. hirsutum</i> ) x CIR1348 ( <i>G. barbadense</i> ).....	110
<b>Tabela 2.</b> QTLs detectados para a característica resistência do algodoeiro ao nematoide <i>Meloidogyne incognita</i> , pelo método de mapeamento por intervalo composto.....	114

## LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Revisão de literatura	Página
<p><b>Figura 1.</b> Base genética dos marcadores microssatélites: (A) Sequência de DNA contendo as regiões repetitivas, (B) genótipos para esse loco de 3 plantas hipotéticas e (C) migração dos diferentes alelos em gel de eletroforese.....</p>	24
<p><b>CAPÍTULO 2:</b> Variabilidade genética e virulência de populações de <i>Meloidogyne incognita</i> a genótipos resistentes de algodoeiro (<i>Gossypium</i> spp.)</p> <p><b>Figura 1.</b> Exemplos de padrões de amplificação das populações de <i>Meloidogyne</i> spp. gerados com primers RAPD G05 (A), ISSR 32 [(GA) 6 GG] (B) e AFLP 08 (GAC TGC GTA CCA CAG ATT T CCT) (C). M: marcador 1kb plus. Populações descritas na Tabela 1.....</p> <p><b>Figura 2.</b> Dendrograma mostrando as relações entre as populações de <i>Meloidogyne</i> spp., através da análise conjunta dos marcadores RAPD e AFLP. Valores de bootstrap (&gt; 50%) com base em 1000 repetições. Populações descritas na Tabela 1.....</p>	74
<p><b>CAPÍTULO 3:</b> Identificação de qtls ligados à resistência a <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3 em um cruzamento de <i>Gossypium hirsutum</i> X <i>Gossypium barbadense</i>.</p> <p><b>Figura 1.</b> Blocos montados em casa de vegetação; e inoculação das plantas de algodão com 10.000 ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3.....</p> <p><b>Figura 2.</b> Mapa genético obtido pela análise de 174 plantas F<sub>2</sub>, resultantes do cruzamento entre <i>Gossypium hirsutum</i> FM 966 e <i>G. barbadense</i> CIR 1348, com 29 grupos de ligação. Os nomes dos locos estão apresentados no lado direito de cada grupo de ligação e as suas posições, em cM (Kosambi, 1944) do lado esquerdo. Nomes na cor preta estão de acordo com a sequência do mapa HDC, marcadores de cor vermelha estão em grupos de ligação diferentes quando comparados com o HDC, já os nomes na cor azul estão no mesmo grupo do mapa HDC, porém em ordem diferente. QTLs ligados à resistência a <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3, identificados por mapeamento por intervalo composto são observados nos cromossomos 11 e 15.....</p>	100
<p><b>Figura 3.</b> Distribuição do índice de galhas (A), do índice de massas de ovos (B) e do fator de reprodução (C) na população F<sub>2</sub> (FM966 x CIR1348). Para se obter o índice de galhas e o índice de massas de ovos foi utilizada a seguinte escala: 0 = nenhuma galha ou massa de ovos; 1= 1-2 galhas ou massas de ovos, 2 = 3-10; 3 = 11-30; 4 = 31-100, 5= &gt; 100 galhas ou massas de ovos (Hartman &amp; Sasser, 1985). Os valores do fator de reprodução (FR) foram transformados em Log (FR+1). FR=PF/PI, sendo PF= população final e PI= população inicial, que é de 10.000 ovos/planta.....</p>	109
<p><b>Figura 4.</b> QTL detectado no cromossomo 11, ligado à resistência ao nematoide <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3. Cada pico acima da linha horizontal, que indica o ponto de corte (LOD score=5,3), representa um possível QTL.....</p>	112
<p><b>Figura 5.</b> QTL detectado no cromossomo 15, ligado à resistência do algodoeiro ao nematoide <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3. O pico acima da linha horizontal, que indica o ponto de corte (LOD score=2,5), representa um possível QTL.....</p>	113
<p><b>Figura 6.</b> QTL detectado no cromossomo 15, ligado à resistência do algodoeiro ao nematoide <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3. O pico acima da linha horizontal, que indica o ponto de corte (LOD score=2,5), representa um possível QTL.....</p>	113

**Figura 6.** Efeitos genéticos dos QTLs do cromossomo 11 (C11) e 15 (C15) do algodoeiro na supressão do índice de galhas (IG), do índice de massas de ovos (IMO) e no logaritmo do fator de reprodução ( $\log (FR+1)$ ).....

115

## RESUMO GERAL

SILVA, Esdras Henrique. **Variabilidade genética e fisiológica de populações de *Meloidogyne incognita* e identificação de QTLs de uma nova fonte de resistência do algodoeiro (*Gossypium* spp.) a esse nematoide.** 2014. 159p. Tese de Doutorado em Fitopatologia – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

O nematoide das galhas *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, 1949 é um dos mais importantes patógenos da cultura do algodoeiro. Sendo assim, é importante determinar a variabilidade genética das populações brasileiras de *M. incognita* provenientes de regiões distintas, e verificar a agressividade/virulência dessas populações em diferentes genótipos de algodoeiro. Dessa maneira o objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética e fisiológica de populações de *M. incognita* coletadas em áreas produtoras de algodão e identificar QTLs associados à resistência ao *M. incognita* raça 3 em um acesso de algodoeiro selvagem (*G. barbadense*). Na análise molecular os resultados mostraram que apenas 2,7% dos fragmentos foram polimórficos. Apesar da existência de duas raças (raças 3 e 4) e dois fenótipos de esterase (I1 e I2), foi observado uma baixa variabilidade genética entre os isolados, o que pode ser devido ao modo de reprodução partenogenético mitótico do patógeno. Os mesmos isolados usados no estudo da variabilidade genética foram inoculados em diferentes genótipos (silvestres e cultivares) objetivando avaliar a virulência/agressividade dos isolados. Nenhuma das populações foi virulenta aos genótipos de algodoeiros resistentes M-315 RNR, TX-25, CIR1343, Wild mexicano Jack Jones e CIR1348, que apresentaram fator de reprodução (FR) < 1. Duas populações de *M. incognita* dos estados de Mato Grosso do Sul e Paraná (Umuarama) (raças 4 e 3, respectivamente) foram altamente agressivas para o controle suscetível FM966 e virulentas para os acessos LA-887 e Clevevilt-6 que mostraram resistência moderada a

outras populações testadas. Visando a introgressão de genes de resistência no algodão cultivado, um mapa de ligação foi construído, usando uma população F<sub>2</sub>, obtida do cruzamento entre o genótipo *Gossypium hirsutum* FM 966 (suscetível a *M. incognita*) e do acesso CIR1348 de *G. barbadense* (resistente). Esse mapa foi baseado em marcadores microssatélites codominantes entre as espécies aparentadas. Um total de 262 marcadores microssatélites já publicados foi usado. Os 262 pares de primers SSR revelaram 284 locos que segregaram dentro da população de mapeamento. Como em outros mapas genéticos de algodão tetraplóide publicado, 19 marcadores amplificaram mais de um loco. O mapa genético construído com a população F<sub>2</sub> consistiu de 29 grupos de ligação. Um comprimento total de 4.294 cM foi obtido e os grupos variaram de 52,8 cM (com 3 marcadores) a 241,3 cM (14 marcadores) com uma distância média de 15,11 cM entre marcadores adjacentes. Esse mapa foi utilizado para o mapeamento de QTLs que estão ligados à resistência ao nematoide *M. incognita* raça 3. Dois QTLs foram identificados pelo método de mapeamento por intervalo composto com valores de LOD mínimo estabelecido pelo software WinQTL Cartographer. Sendo que um QTL se encontra no grupo 11 e outro no grupo 15. Marcadores associados a estes QTLs, também foram identificados. No cromossomo 11, foram encontrados os marcadores CIR069a e CIR316b. Já no cromossomo 15, foram encontrados os marcadores JESPR152 e NAU3254.

**Palavras- Chaves:** mapeamento de QTLs, resistência, seleção assistida, virulência

---

Orientador: Prof. Cleber Furlanetto, Ph.D – Universidade de Brasília

Co-orientadora: Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro, Ph.D – Embrapa Cenargen

## GENERAL ABSTRACT

SILVA, Esdras Henrique. **Genetic and physiological variability of *Meloidogyne incognita* populations to resistant cotton genotypes (*Gossypium* spp.) and identification of QTLs associated with resistance to this nematode.** 2014. 161p. Doctoral dissertation in Plant Pathology – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

The root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, 1949 is a major pathogen of cotton (*Gossypium* spp.), worldwide. The objectives of this second chapter were to assess the thus that it is important to study and understand the genetic variability and aggressiveness of Brazilian populations of 4 of *M. incognita* in cotton. Five isolates of *M. incognita* and one isolate of *M. enterolobii* (outgroup) were used for the molecular analyses through RAPD markers. Results showed that only 2.7% of the fragments were polymorphic. Despite the existence of two races (races 3 and 4) and two esterase phenotypes (I1 and I2), a low genetic variability among isolates was observed, which might be due to the mitotic parthenogenetic mode of reproduction of this pathogen. The same populations were also used to study the aggressiveness/virulence towards different cotton genotypes. None of the populations was virulent to the resistant cotton genotypes M-315 RNR, TX-25, CIR1343, Wild Mexican Jack Jones and CIR1348, that presented  $RF < 1.0$ . Two populations of *M. incognita* from the states of Mato Grosso do Sul and Paraná (Umuarama) (races 4 and 3, respectively) were highly aggressive to the susceptible control FM966 and virulent to the accessions LA-887 and Clevevilt-6 that showed moderate resistance to the other populations tested. The objectives of the third chapter were to introgress gene(s) for resistance to *M. incognita* race 3 from *G. barbadense* access CIR1348 (resistant) into cultivated *G. hirsutum* variety FM 966 (susceptible) using a F2 population from crosses between the two

genotypes and to build a genetic linkage map. This map was based on a set of co-dominant microsatellite markers present in the two species. A total of 232 microsatellite markers published elsewhere were used. The 232 pairs of SSR primers revealed 284 loci that segregated within the mapping population. Similar to published genetic maps of tetraploid cotton genotypes, some markers amplified more than a locus. The genetic map constructed with the F2 population consisted of 29 linkage groups. A total length of 4,294 cM was obtained and groups varied from 52.8 cM (with 3 markers) to 241.3 cM (14 markers) with an average distance of 15.11 cM between adjacent markers. This map was used for the identification of quantitative trait loci (QTLs) possibly associated with resistance to *M. incognita* race 3. Two QTLs were identified by composite interval mapping method with values of minimum LOD established by the software WinQTL Cartographer. One QTL is found in group 11 and another in group 15. Markers associated with these QTLs were also identified. Markers CIR069a and CIR316b were found on chromosome 11, while markers JESPR152 and NAU3254 were found on chromosome 15.

**Keywords:** QTL mapping, resistance, assisted selection, virulence

---

Adviser: Cleber Furlanetto, PhD – Universidade de Brasília

Co-adviser: Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro, PhD – Embrapa Cenargen

## INTRODUÇÃO GERAL

O nematoide das galhas *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood 1949 é um importante patógeno em algodão (*Gossypium hirsutum* L.) em áreas produtoras em todo o mundo (Starr *et al.*, 2007), causando danos diretos e aumentando a incidência e a severidade de outras doenças, em particular, a fusariose, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder. Hans (Jeffers & Roberts, 1993; Abawi & Chen, 1998). As raças 3 e 4 desse nematoide são capazes de parasitar algodão nos Estados Unidos (Veech & Starr, 1986) e no Brasil.

O controle mais eficiente para o nematoide das galhas é por meio da utilização de variedades resistentes, que ajudam a controlar a doença, mantêm o rendimento da cultura e diminuem a população de nematoides presentes no solo, melhorando assim os rendimentos dos próximos cultivos (Ruano *et al.*, 1997; Davis & Kemerait, 2009). No entanto, a exposição contínua de variedades resistentes a nematoides pode induzir o aparecimento de isolados capazes de suplantar a resistência, ou seja, burlar os mecanismos de resistência ocorrendo a “quebra de resistência”, o que pode ocorrer em algumas gerações do patógeno (Netscher, 1977; Janssen *et al.*, 1998). Grande parte das informações sobre virulência em *Meloidogyne* spp. está relacionada ao gene Mi de resistência em tomate (Roberts, 1992; Roberts *et al.*, 1995) ou genótipos de feijão-frade com o gene de resistência Rk (Roberts *et al.*, 1995). No algodão, a seleção de isolados com elevada reprodução em variedades resistentes tem sido demonstrada (Ogallo *et al.*, 1997). A resistência atribuída por um único ou poucos genes, geralmente, possui pouca duração, pois, devido a resistência ser monogênica e possuir apenas um mecanismo de ação está mais propensa a ser quebrada pelo nematoide.

Atualmente, o melhoramento genético do algodão resistente ao nematoide das galhas depende de um número reduzido de fontes de resistência, com apenas um pequeno número de genes envolvidos (Robinson *et al.*, 2001; McPherson *et al.*, 2004, Starr *et al.*, 2010). Além disso, a variabilidade na virulência de isolados de *Meloidogyne* spp. em genótipos resistentes de algodão tem sido relatada (Elliott *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2000; Anwar & McKenry, 2007). Sendo assim, há necessidade de identificar novas fontes de resistência e aumentar o número de genes úteis e, também, é necessário estudar a extensão da variabilidade, agressividade e virulência das populações de *Meloidogyne* spp. de diferentes regiões produtoras de algodão em relação aos genótipos resistentes e tolerantes de algodoeiro.

Devido à impossibilidade prática em realizar inoculações artificiais nos genótipos gerados a cada ano pelos programas de melhoramento de algodoeiro, quase toda a avaliação da resistência ao nematoide das galhas é realizada em campos infestados. De modo geral, a quantidade de inóculo naturalmente presente em campo não é homogênea o que dificulta a seleção de genótipos resistentes. Portanto, a confiabilidade do processo de seleção é pequena, ocorrendo a possibilidades de eliminar plantas com níveis adequados de resistência e manter outras suscetíveis até estágios avançados do programa de melhoramento.

O desenvolvimento de ferramentas de biotecnologia tais como marcadores moleculares, tem auxiliado tanto na caracterização genética de resistência como na introgressão de genes em programas de melhoramento genético. Em casos de dificuldade de seleção de genótipos resistentes por meio de fenotipagem, como é o caso da seleção para a resistência ao nematoide das galhas, o uso dessas novas ferramentas por meio de seleção assistida por marcadores moleculares é plenamente justificada.

Nesses casos, as limitações na seleção fenotípica são superadas quando se emprega a seleção genotípica por meio de marcadores moleculares. Não havendo o componente ambiental, a variação é apenas de origem genética com herdabilidade máxima e maiores ganhos genéticos em curto prazo.

## **OBJETIVO GERAL**

Estudar a variabilidade genética e fisiológica de populações de *M. incognita* coletadas em áreas produtoras de algodão e identificar QTLs associados à resistência ao *M. incognita* raça 3 em um acesso de algodoeiro selvagem (*G. barbadense*).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Estudar a variabilidade genética de populações de *M. incognita* coletadas em áreas de produção de algodão através dos marcadores moleculares neutros RAPD, ISSR e AFLP; analisar a reação de genótipos de algodoeiros quanto à resistência ou suscetibilidade às populações de *M. incognita* coletadas em áreas produtoras de algodão; obter uma população F2 segregante proveniente do cruzamento de um acesso resistente CIR1348 (*G. barbadense*) e um suscetível FM966 (*G. hirsutum*) e realizar a fenotipagem usando uma população de *M. incognita* raça 3; realizar a genotipagem das plantas F2 através de marcadores microssatélites com a finalidade de construir um mapa genético e compará-lo com um mapa de algodão já publicado; combinar os dados de fenotipagem com a genotipagem e identificar QTLs e marcadores que estejam associados com a resistência do acesso CIR1348 ao *M. incognita* raça 3.

# CAPÍTULO 1

---

---

## REVISÃO DE LITERATURA

## 1. A cultura do algodoeiro

O algodoeiro pertence ao gênero *Gossypium*, que além das plantas cultivadas, comporta plantas selvagens. As cerca de 50 espécies de *Gossypium* são endêmicas das regiões tropicais e sub-tropicais da Austrália, África, Ásia, América Central e do Sul (Wendel & Albert, 1992; Percival *et al.*, 1999; Wendel *et al.*, 2009). O termo ‘algodoeiro’ refere-se a quatro espécies do gênero *Gossypium*, *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L. e *G. herbaceum* L., que foram cultivadas independentemente como fonte de fibra (Brubaker *et al.*, 1999). Nos dias atuais, as espécies tetraploides *G. hirsutum* e *G. barbadense* constituem as duas espécies mais cultivadas, sendo que *G. hirsutum* contribui com aproximadamente 95% do algodão produzido mundialmente. As espécies diploides *G. arboreum* e *G. herbaceum* ainda são cultivadas em algumas áreas da Ásia, como a Índia e o Paquistão (Ogrt, 2002).

*Gossypium barbadense* é uma espécie originária da América do Sul, cujo centro de domesticação é o Peru e o Equador (Percy & Wendel, 1990; Westengen *et al.*, 2005). Essa espécie é constituída por duas entidades arbóreas: raça barbadense e raça brasiliense, esta compõe o algodão conhecido como ‘rim-de-boi’ da Bacia Amazônica (Brubaker, 1999). As cultivares elites de *G. barbadense* são representadas por ‘Sea Island’, ‘Creole’, ‘Egyptian’, ‘ELS’ (extra long-staple), ‘Indian’ e ‘Pima’ (Percy, 2009). A espécie *G. hirsutum*, cujo centro original de domesticação provavelmente encontra-se no México, é o algodoeiro mais cultivado mundialmente, conhecido principalmente como upland cotton ou algodão herbáceo (Brubaker *et al.*, 1999). Hutchinson (1951) reconheceu sete raças de *G. hirsutum*: yucatanense, punctatum, palmeri, latifolium, marie-galante, morrilli e richmondi. Dessas, punctatum, latifolium e marie-galante

sofreram dispersão, sendo consideradas as raças a partir das quais derivaram as modernas cultivares de algodão *upland* (Lubbers & Chee, 2009).

Atualmente, o algodão herbáceo (*G. hirsutum* raça *latifolium* Hutch.) é uma das dez principais espécies domesticadas pelo ser humano, fornecendo fibras para produção de tecidos, óleo utilizado para alimentação humana e para produção de energia (biodiesel), além de farinhas para produção de ração animal (Beltrão & Azevedo, 2008). O algodoeiro é cultivado entre as latitudes 45° norte e 30° sul. Durante todo o ciclo, são necessários dias predominantemente ensolarados, com temperaturas médias entre 22°C até 30°C, não suportando temperaturas inferiores a 5°C. A planta requer, para um ciclo de 160 dias, entre 750 mm a 900 mm de água bem distribuídos no período. Satisfeitas as condições de água e temperatura, a cultura tem se desenvolvido com sucesso em altitudes variando de 200 m a 1.000 m, com ciclo que pode aumentar em até 40 dias em altitudes superiores a 600 m. Nas espécies cultivadas comercialmente o estágio do florescimento ocorre de 40 a 70 dias após a semeadura. Após o florescimento, a parte interna da flor desenvolve-se gradualmente por cerca de 40 a 70 dias em um fruto (capulho), com as sementes e as fibras (Beltrão, 1999; Cia *et al.*, 1999). A produção de algodão exige solos férteis em matéria orgânica, fósforo e potássio, e com teores de nutrientes equilibrados. São desfavoráveis solos ácidos ou pobres em nutrientes, úmidos ou sujeitos à encharcamento, rasos e compactados (Buainain & Batalha, 2007).

Os insetos-praga constituem um dos principais problemas agronômicos desta cultura, causando grandes prejuízos econômicos anualmente. As pragas que atacam o algodoeiro podem ser divididas em dois grupos: i) as que ocorrem principalmente no estabelecimento da cultura (broca-da-raiz, tripses, broca-do-ponteiro, percevejo castanho, pulgão e cigarrinha); e ii) as que ocorrem principalmente no florescimento e na

frutificação (curuquerê, mosca branca, lagarta-das-maçãs, ácaro branco, ácaro rajado, percevejo rajado, percevejo manchador, lagarta militar, lagarta rosada e bicudo). O ataque de pragas, principalmente as do segundo grupo, é razão de prejuízos consideráveis à cotonicultura, pois compromete a produtividade, a qualidade das fibras e eleva os custos de produção. A forma mais racional do controle de pragas é pelo manejo integrado, que considera medidas como: destruição de soqueiras, época e concentração de plantio, uso de cultivares tolerantes, rotação de cultura, monitoramento populacional das pragas, controle de bordaduras e focos, uso de feromônios. Na safra de 2012/2013 a praga *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) foi encontrada parasitando algodoeiro na Bahia, a larva desse inseto tem surpreendido produtores e pesquisadores pelo seu poder de destruição, ela ataca desde os estágios iniciais até a fase de maturação das plantas.

O controle químico é muito usado, seja por meio de produtos sistêmicos ou de contato, o que eleva consideravelmente os custos. O uso de produtos químicos para o controle de pragas pode chegar a até 25% do custo da produção. Nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil são efetuadas, em média, 18 aplicações de pesticidas químicos durante o ciclo da cultura. Na região Centro-Oeste, onde as lavouras são mais recentes, há a necessidade de onze aplicações só para controlar uma das pragas principais, o bicudo do algodoeiro. Nesse cenário, o uso de variedades transgênicas com resistência a insetos é um fator de vantagem para o cultivo de algodão. Haja vista que variedades de algodão transgênico resistentes a insetos já foram liberadas para comercialização na África do Sul, Argentina, Austrália, China, Colômbia, Índia, Indonésia, México e Estados Unidos e, inclusive, no Brasil.

O algodoeiro é afetado por doenças altamente destrutivas, como as marchas de *Fusarium* e de *Verticillium*, nematoses, mancha-angular, ramulose e mosaico das nervuras. Mesmo doenças tidas no passado como secundárias (manchas de *Alternaria*, mancha de *Ramularia*, cercosporiose e outras manchas foliares) podem tornar-se importantes se incidirem em cultivares suscetíveis. O controle mais racional e econômico desses patógenos ocorre mediante o uso de cultivares resistentes ou tolerantes, complementado por medidas profiláticas ou práticas culturais, dentre elas o uso de sementes saudáveis, rotação de culturas, destruição de restos culturais, espaçamentos apropriados e adubações equilibradas. O controle químico é recomendado para o tratamento de sementes e para algumas dessas doenças, especialmente as foliares, quando cultivares resistentes ou tolerantes não são utilizadas (Beltrão, 1999; Cia et al., 1999).

## **2. Produção mundial de algodão**

O algodão está entre as mais importantes culturas de fibras no mundo. Todos os anos, uma média de 35 milhões de hectares de algodão é plantada por todo o planeta. A demanda mundial tem aumentado gradativamente desde a década de 1950, a um crescimento anual médio de 2%. O comércio mundial do algodão movimenta anualmente cerca de US\$ 12 bilhões e envolve mais de 350 milhões de pessoas em sua produção, desde as fazendas até a logística, o descaroçamento, o processamento e a embalagem. Atualmente, o algodão é produzido por mais de 60 países, nos cinco continentes. Cinco países – China, Índia, Estados Unidos, Paquistão e Brasil – despontam como os principais produtores da fibra (sítio Abrapa).

O Brasil é responsável por mais de um milhão de hectares, o que coloca o país no quinto lugar no ranking mundial de área colhida (Conab, 2014). A China e a Índia são os maiores produtores mundiais de algodão, os dois países juntos produzem quase a metade do algodão produzindo em todo o mundo, sendo a produção da China de 6.7 milhões de toneladas e a produção da Índia de 6.3 milhões de toneladas. A produção mundial para a safra de 2013/2014 é estimada em 25,6 milhões de toneladas. Nas últimas três safras, com volume médio próximo de 1,7 milhão de toneladas de pluma, o Brasil está entre os cinco maiores produtores mundiais, ao lado de países como China, Índia, EUA e Paquistão. As estimativas para a safra atual são em torno de 1.655 milhões de toneladas, equivalente a aproximadamente 6,46% da produção mundial (Conab, 2014).

O Brasil tem hoje uma área plantada com algodão de 1.074,2 milhões hectares, os estados de Mato Grosso, Bahia e Goiás concentram grande parte da produção brasileira de algodão, com destaque para a região Centro-Oeste, a qual ostenta a maior produtividade nacional (Abrapa, 2014). Nesse cenário o estado do Mato Grosso se destaca tanto com a maior área plantada, como com a maior produção (Conab, 2014).

### **3. Nematoides parasitas do algodoeiro**

(Kirkpatrick & Rothrock, 2001). No Brasil, os principais nematoides causadores de danos à cultura do algodoeiro são *M. incognita*, *R. reniformis* e *Pratylenchus brachyurus* (Inomoto, 2001). Dentre as espécies de nematoides parasitas do algodoeiro, *M. incognita* merece destaque pela sua ampla distribuição e capacidade de sobrevivência, haja vista que ele infecta plantas das mais diversas famílias botânicas. Nessa espécie, apenas as raças 3 e 4 parasitam o algodoeiro, sendo a raça 3 a mais

encontrada em áreas de produção comercial (Inomoto, 2001). O parasitismo por nematoides em plantas de algodoeiro pode ocorrer em diferentes tipos de solo, sendo os arenosos mais propícios à disseminação e infecção por *M. incognita* (Asmus, 2004). A presença de *M. incognita* em altas populações pode inviabilizar o cultivo, com relatos de abandono de áreas infestadas nos estados de São Paulo e Goiás (Ide, 2000). Na região centro-Oeste, *M. incognita* raça 3 e 4 apresenta distribuição restrita, por ser uma região relativamente nova para a cultura do algodão.

#### **4. Classificação do gênero *Meloidogyne***

As espécies do gênero *Meloidogyne* constituem uma pequena parte do Filo Nematoda, que compreende os nematoides em geral, incluindo os parasitas do homem, dos animais e de plantas, além de espécies de vida livre no solo, água doce e no mar (Maggenti, 1981). O gênero *Meloidogyne* faz parte da classe Chromadorea, ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Infraordem Tylenchomorpha, Superfamília Tylenchoidea e família Meloidogynidae (De Ley & Blaxter, 2002; Karsen & Moens, 2006).

Até junho de 2009, havia 97 espécies válidas pertencentes ao gênero *Meloidogyne* (Hunt & Handoo, 2009). Dentre essas, a maioria tem reprodução partenogenética. A sistemática desses organismos não pode ser incluída na definição clássica de espécie, a qual se baseia em formas de reprodução anfimítica. A diversidade biológica e genética que ocorre em *Meloidogyne* spp. é bastante complexa e difícil de ser compreendida. Por um lado, a reprodução partenogenética forma organismos poliplóides e estabiliza o genoma da sua descendência; por outro lado, cada mutante que

conseguir se reproduzir dará origem a um clone diferente da população mãe (Triantaphyllou, 1985).

### **5. Ciclo de vida e comportamento de *Meloidogyne* spp.**

O ciclo de vida de *Meloidogyne* inicia-se com a fêmea depositando seus ovos em um único local da raiz, formando massa de ovos envoltos em uma matriz gelatinosa (Taylor & Sasser, 1983). Essa matriz mantém os ovos unidos e protegidos contra condições ambientais adversas e predação, além de apresentar propriedades antimicrobianas (Orion & Kritzman, 1991). No interior dos ovos, o desenvolvimento embrionário resulta no juvenil de primeiro estágio (J1) que passa por uma ecdise, dando origem ao juvenil de segundo estágio (J2). De maneira geral, o J2 eclode quando há condições ambientais favoráveis à sua sobrevivência, tais como temperatura apropriada, disponibilidade de oxigênio e níveis de umidade do solo adequados (Curtis *et al.*, 2009). Esse estágio móvel (J2), vermiforme, infectante migra através do solo atraído por substâncias que emanam das plantas e penetra nas raízes da hospedeira. Os J2 movem-se por entre as células dos tecidos da planta com o auxílio do estilete, migrando até a zona de alongação da raiz, na periferia do cilindro central estabelecem seus sítios de alimentação no parênquima vascular iniciando um complexo relacionamento com a planta (Taylor & Sasser, 1983). O início da alimentação do J2 em células do protoxilema e protofloema induz a diferenciação dessas células em células especializadas, chamadas células gigantes (Moens *et al.*, 2009). Uma vez que as células gigantes são iniciadas, o nematoide torna-se sedentário e ocorre então a segunda (J2 torna-se J3), a terceira (J3 torna-se J4) e a quarta ecdises (J4 torna-se fêmea jovem ou macho) (Eisenback & Triantaphyllou, 1991; Moens *et al.*, 2009). Logo após a última

ecdise, a fêmea jovem começa a se alimentar, permanecendo ali o restante de sua vida, em condições ideais o ciclo de vida desse parasita dura aproximadamente 30 dias. Ocorre a hiperplasia e hipertrofia das células resultando, geralmente, na formação da galha radicular (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). A formação de galhas radiculares pode variar entre as espécies de *Meloidogyne* e as plantas hospedeiras. *Meloidogyne hapla*, por exemplo, é particularmente conhecida pela incidência elevada de raízes adventícias que se desenvolvem a partir das galhas radiculares (Sasser, 1954; Moens *et al.*, 2009). Em algumas hospedeiras, as galhas podem ser pequenas ou indistintas, resultando muitas vezes na não identificação do parasitismo (Moens *et al.*, 2009).

Os machos, quando presentes, são vermiformes e não há evidências que eles se alimentam (Moens *et al.*, 2009). A mudança de forma nos machos (piriforme para adulto vermiforme) ocorre durante o quarto estágio juvenil (J4) (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). A maioria das espécies de *Meloidogyne* é partenogenética. Algumas se reproduzem por partenogênese meiótica facultativa. As espécies economicamente mais importantes, tais como *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*, possuem modo de reprodução partenogenético mitótico obrigatório (revisado por Castagnone-Sereno, 2006).

Em condições normais, a quase totalidade dos adultos formados de *Meloidogyne* spp. são fêmeas. Porém, em condições ambientais desfavoráveis, com elevada população de nematoides na raiz ou resistência da planta hospedeira, os juvenis que se desenvolveriam em fêmeas, tornam-se machos, pois seu primórdio sexual se desenvolve em testículos em vez de ovários. Tal fenômeno é conhecido por reversão sexual e é um dos mecanismos de sobrevivência desses nematoides, pois assim a população de fêmeas

irá reduzir e o parasitismo sobre a planta infectada será mais brando, garantindo a sobrevivência das fêmeas formadas (Freitas *et al.*, 2006).

A duração do ciclo de vida do nematoide das galhas é fortemente afetada pela temperatura, umidade e planta hospedeira. As fêmeas produzem ovos por três semanas, depois cessam a produção, podendo viver um pouco mais. Os machos vivem semanas e os J2 podem viver de poucos dias a meses (Taylor & Sasser, 1983).

Algumas espécies de *Meloidogyne* só podem ser separadas umas das outras por suas preferências de hospedeiro. Essas preferências são denominadas raças biológicas ou fisiológicas. Eisenback (1983) relata que *M. incognita* apresenta quatro raças fisiológicas. Todas as raças reproduzem-se em tomate cultivar Rutger; melancia cultivar Charleston Gray e pimentão cultivar Early California Wonder; porém, suas repostas à cultivar NC 95 de fumo e à cultivar de algodão Deltapine 61 variam com a raça, e nenhuma se multiplica em amendoim Florunner como mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1-** Teste para determinação de raças de *Meloidogyne incognita* em plantas hospedeiras diferenciadoras, segundo Taylor & Sasser (1978).

<i>M. incognita</i>	Fumo	Algodão	Pimenta	Melancia	Amendoim	Tomate
Raça 1	-	-	+	+	-	+
Raça 2	+	-	+	+	-	+
Raça 3	-	+	+	+	-	+
Raça 4	+	+	+	+	-	+

Fonte: Taylor & Sasser (1978).

As raças 3 e 4 que parasitam o algodoeiro, estão presentes em praticamente todas as regiões produtoras do mundo, principalmente nas áreas com solo de textura arenosa e de baixa fertilidade (Starr & Page, 1993).

## **6. Diversidade do gênero *Meloidogyne* e o uso de marcadores moleculares para o seu estudo**

Existem 97 espécies válidas pertencentes ao gênero *Meloidogyne* (Hunt & Handoo, 2009). Dentre estas, a maioria tem reprodução partenogenética. A sistemática desses organismos não pode ser incluída na definição clássica de espécie, a qual se baseia em formas de reprodução anfimítica. A diversidade biológica e genética que ocorre em *Meloidogyne* spp. é bastante complexa e difícil de ser compreendida. Por um lado, a reprodução partenogenética gera organismos poliploides e estabiliza o genoma da sua descendência; por outro lado, cada mutante que conseguir se reproduzir dará origem a um clone diferente da população mãe (Triantaphyllou, 1985).

Estudos enzimáticos extensivos, com cerca de 800 populações originárias de diferentes países têm demonstrado que as espécies de *Meloidogyne* podem ser diferenciadas por meio de marcadores enzimáticos, sobretudo as esterases (EST) e malato desidrogenases (MDH) (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro *et al.*, 1996; 2000). Infelizmente, não há padrões enzimáticos para todas as espécies descritas e esses perfis não fornecem informações suficientes para estudos de raças fisiológicas e variabilidade intraespecífica. A variabilidade intraespecífica no que diz respeito a enzimas é geralmente muito baixa. Isso pode ser explicado pelo fato das enzimas serem produzidas, através da expressão de genes altamente conservados e representarem apenas uma fração muito pequena do genoma, enquanto as regiões não codantes são mais abundantes e submetidas a extensivas mudanças evolutivas (McLain *et al.* 1987).

O desenvolvimento de técnicas moleculares abriu novas perspectivas quanto à identificação de espécies e estudos da variabilidade intraespecífica dos nematoides de galhas. Assim, estudos foram realizados a partir da análise do polimorfismo do

comprimento dos fragmentos de restrição do DNA (RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Curran *et al.*, 1986; Castagnone-Sereno *et al.*, 1991, 1993a). O advento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) fez progredir de maneira considerável os métodos de análise e diferentes estudos sobre o DNA mitocondrial e ribossômico que foram realizados em isolados de *Meloidogyne* spp. (Harris *et al.*, 1990; Powers *et al.*, 1997; Zijlstra *et al.*, 1997).

A técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), baseada na PCR, é utilizada atualmente para os estudos genéticos e para a diferenciação de várias espécies de *Meloidogyne*, a partir de perfis gerados com o auxílio de primers aleatórios (Cenis, 1993; Castagnone - Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Randig *et al.*, 2002). A análise de RAPD, além de utilizar pequenas quantidades de material genético (6 - 30 ng DNA), não necessita do conhecimento prévio do genoma a ser estudado, pois se utilizam primers de sequência aleatória (Williams *et al.*, 1990). A técnica é considerada simples, rápida e de baixo custo quando comparada a RFLP. A principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco. Apenas um alelo, frequentemente, é detectado, o segmento que é amplificado, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo. Os marcadores RAPD, portanto, comportam-se como marcadores dominantes: os dados têm natureza binária (presença ou ausência de fragmentos). Genótipos heterozigotos não podem ser diretamente discriminados dos homozigotos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

De forma semelhante à análise de RAPD, a técnica de AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) (Semblat *et al.*, 1998) permite a detecção de polimorfismo específico e/ou subespecífico em *Meloidogyne* spp. A vantagem apresentada por essa técnica é o grande número de fragmentos gerados em um único gel

(Ferreira & Grattapaglia, 1998). Outra vantagem é o grande poder de detecção de variabilidade genética. Ela explora simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição, tal como no ensaio de RFLP e, a ocorrência ou não de amplificação a partir de sequências arbitrárias, tal como o ensaio RAPD, caracterizando-se uma flexibilidade significativa na obtenção de marcadores polimórficos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A limitação da técnica, de forma análoga aos marcadores RAPD, é o baixo conteúdo de informação genética por loco. Além disso, a análise de AFLP envolve maior número de etapas do que a de RAPD (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A conversão dos marcadores RAPD em SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), termo cunhado por Paran & Michelmore (1993) para definir marcadores RAPD cuja sequência interna tenha sido determinada, permitindo compor primers mais longos, ricos em GC (guanina-citosina) e de sequência específica que tem sido utilizada para a identificação de espécies. Entre as vantagens dos marcadores SCAR, em relação aos marcadores RAPD, destaca-se a maior reprodutibilidade, pois a técnica RAPD, quando executada sob diferentes condições, tais como qualidade e quantidade do DNA, marcas de enzimas e de termociclador, pode apresentar variação no perfil amplificado (Jones *et al.*, 1997). Os marcadores SCAR podem ser utilizados como pontos de referência física do genoma, servindo para mapeamento, ou como marcadores genéticos, quando estão associados a algum genótipo ou fenótipo de interesse (Mienie *et al.* 2002; Noir *et al.*, 2003).

Nos nematoides das galhas, marcadores SCAR já foram desenvolvidos para identificar duas espécies quarentenária para o Brasil, *M. chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980 e *M. fallax* Karssen, 1996, ou ainda, para separar as três espécies:

*M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, presentes principalmente em regiões tropicais e subtropicais ou em plantios em sistema protegido (Zijlstra, 2000; Zijlstra *et al.*, 2000; Fourie *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2004). Marcadores SCAR espécie–específicos foram definidos para as três principais espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro: *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* (Randig *et al.*, 2002), além de *M. arabicida* e *M. izalcoensis*, espécies de menor incidência no café (Correa *et al.*, 2013a). Marcador SCAR foi desenvolvido também para *M. ethiopica*, espécie de grande ocorrência em videiras no Chile (Correa *et al.*, 2013b).

O primeiro estudo sobre diversidade de populações brasileiras de *Meloidogyne* spp. foi realizado por Randig *et al.* (2002) em que foram estudadas através de PCR-RAPD, 18 populações de *Meloidogyne* spp., provenientes de diferentes regiões do Brasil, caracterizadas previamente quanto ao perfil isoenzimático (Carneiro *et al.*, 2000). Nesse estudo, observou-se que as diferentes espécies de *Meloidogyne* se diferenciaram em clusters, de acordo com os perfis enzimáticos e que nenhuma separação de raças por meio de marcadores moleculares foi observada. Um alto grau de variabilidade intraespecífica foi observado em populações de *M. exigua*, *M. hapla* e *M. arenaria*, que apresentaram: 67,5%, 67,5% e 69,8% de polimorfismo. Diferentemente, populações de *M. javanica* e *M. incognita* apresentaram baixa variabilidade intraespecífica, 19% e 30%, respectivamente.

*Meloidogyne javanica* tem sido relatada como uma espécie que apresenta baixa variabilidade intraespecífica (Castgnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997). Estudos realizados por Cofcewicz *et al.* (2004) com sete populações de *M. javanica* provenientes de bananeiras de diferentes regiões do Brasil revelaram uma variabilidade intraespecífica de 29,1%, que ainda é considerada baixa. Entretanto, estudos realizados por

Carneiro *et al.* (1998), com quatro populações brasileiras de *M. javanica*, mostraram variabilidades morfológica, enzimática, fisiológica e genética. A presença de quatro raças fisiológicas detectadas em *M. javanica* é outro exemplo da variabilidade intra-específica observada nessa espécie (Carneiro *et al.*, 2003).

Estudos realizados por Muniz *et al.* (2008) com 16 populações de *M. exigua*, revelaram polimorfismo intraespecífico elevado (24,6 – 57,8 %) para essa espécie. Entretanto, todas as populações agruparam-se com 100% bootstrap apesar da grande variabilidade intraespecífica encontrada. Diferentemente de *M. exigua*, a grande variabilidade encontrada em populações de *M. arenaria* revelou a presença de espécies distintas dentro da mesma espécie como é o caso de *M. morocciensis* anteriormente identificada como *M. arenaria* (EST A3) (Carneiro *et al.*, 2008).

Estudos sobre a variabilidade genética de *M. incognita* provenientes de diferentes culturas e apresentando diferentes fenótipos enzimáticos, com a utilização de marcadores moleculares demonstraram que a espécie possui baixa variabilidade genética (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.* 1997; Randig *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2004; Cofcewicz *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2012). Isso pode estar relacionado com o modo de reprodução da espécie, partenogenética mitótica, que em teoria geraria descendentes clonais (Triantaphyllou, 1985).

A variação intraespecífica de *Meloidogyne* spp. em relação à interação planta-nematoide pode ser expressa em três diferentes níveis: hospedabilidade, agressividade e virulência. Nesse contexto, as espécies vegetais podem ser boas hospedeiras, más hospedeiras ou não hospedeiras de determinada espécie de *Meloidogyne* ou grupo de espécies. Diferenças encontradas no círculo de hospedeiras conduziu ao conceito das raças fisiológicas, que foram relatadas para importantes espécies como *M. javanica*

(Rammah & Hirschmann, 1990; Carneiro *et al.*, 2003), *M. incognita*, *M. arenaria* (Sasser, 1980), *M. hapla* (Wofford *et al.*, 1989), *M. exigua* (Silva, 2005) e *M. chitwoodi* (Mojtahedi *et al.*, 1988).

A agressividade reflete a habilidade de reprodução dos nematoides em hospedeiras suscetíveis, enquanto que a virulência é a capacidade do patógeno em se reproduzir em uma hospedeira resistente. Nesta situação, há interação de genes de virulência do nematoide com genes de resistência da hospedeira (Hussey & Janssen, 2002; Roberts, 2002).

Grande parte das informações sobre virulência em *Meloidogyne* spp. está relacionada com o gene Mi de resistência em tomate. A partir do ano de 1950, a ocorrência de quebras de resistência por isolados das espécies *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* foram relatadas e designadas como “B-races” ou raças-B. Observou-se quebra de resistência em campo, inclusive, em populações não expostas anteriormente a cultivares resistentes (Roberts & Thomason, 1989; Hussey & Janssen, 2002).

Experimentos de seleção de genótipos em laboratórios mostraram que a proporção de nematoides virulentos aumentava gradualmente após sucessivas gerações na cultivar resistente de tomate (Netscher, 1977). Considerando que *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* são espécies partenogênicas mitóticas obrigatórias, mecanismos além da recombinação gênica devem ser responsáveis pela crescente virulência (Triantaphyllou, 1987).

## **7. Melhoramento genético de planta por meio de ferramentas moleculares**

Antigamente nos programas de melhoramento genético de plantas o procedimento de seleção dos genótipos que apresentavam características desejáveis era realizado

apenas com base nas informações fenotípicas dos indivíduos (cor e formato das sementes, cor do cotilédone, cor e formato das pétalas e brácteas das flores). Mas, o surgimento das técnicas de marcadores de DNA com capacidade de detectar variação genética adicional trouxe avanços para o melhoramento genético. A principal colaboração dessa técnica é possibilitar a análise do genótipo de um indivíduo, por meio de um marcador molecular, sem a necessidade da ocorrência da expressão fenotípica, excluindo-se a influência do ambiente.

A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) apresenta algumas vantagens em relação à seleção fenotípica (SF), como exemplo pode-se citar a realização de piramidação de genes, a qual busca concentrar em um único genótipo, diferentes características de interesse (por exemplo, a resistência a diferentes patógenos). Com o uso da SAM há uma redução no tempo necessário para obter esse genótipo. O SAM também é usado para selecionar caracteres em que a avaliação fenotípica apresenta elevado custo, ou exige ambientes específicos (déficit hídrico, inoculação de patógenos), quando exigem destruição da planta e quando o caráter de interesse só se manifesta em fases avançadas do desenvolvimento da planta. Outra vantagem sobre a SF é que a SAM pode ser realizada nos estágios iniciais, reduzindo significativamente o tempo necessário para um ciclo de seleção (Xu & Crouch, 2008). Um dos primeiros trabalhos sobre seleção assistida por marcadores foi feito por Stuber *et al.* (1982), com a utilização de oito locos isoenzimáticos em uma população melhorada de milho. O programa de melhoramento que visa a resistência da soja ao nematoide de cisto, vem sendo auxiliado pela SAM (Concibido *et al.*, 1996; Schuster *et al.*, 2001).

Existem vários tipos de marcadores moleculares disponíveis para estudo genéticos, sendo que os mais utilizados são as isoenzimas, o RFLP, o RAPD, o AFLP e os microssatélites (SSR). Na década de 50, com a descoberta de que as formas alélicas de enzimas podiam ser separadas por eletroforese, iniciou-se a era dos marcadores moleculares na genética. Já na década de 80, os marcadores baseados em DNA, como RFLP e RAPD, passaram a ser utilizados. Os marcadores moleculares, em comparação com os morfológicos, têm as vantagens de serem fenotipicamente neutros, polimórficos, abundantes e alguns deles apresentarem herança codominante (Tanksley, 1993).

**Marcadores microssatélites:** os marcadores microssatélites foram primeiramente desenvolvidos em humanos (Litt & Luty, 1989) e logo receberam a atenção dos melhoristas e geneticistas de plantas, pois vários estudos demonstraram que os microssatélites são amplamente distribuídos no genoma das espécies (Brunel, 1994). Em genomas de eucariotos, estas sequências simples são muito frequentes, distribuídas ao acaso além de constituírem locos genéticos altamente polimórficos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Em drosófilas, 30% do genoma é formado por este tipo de sequência; no arroz, 50%; e no tabaco chega a 70% (Lewin, 2001). Marcadores moleculares SSRs têm sido amplamente utilizados para seleção assistida de genótipos em programas de melhoramento genético.

Marcadores microssatélites ou SSR são conjuntos de sequências de um a seis nucleotídeos ('motif') que se repetem ('tandem') em vários pontos do genoma de eucariotos (Litt & Luty, 1989). De acordo com Brondani *et al.* (1998), os microssatélites são muito atrativos aos melhoristas vegetais, pois eles combinam várias vantagens, como: 1) natureza codominante e multialélica; 2) por serem altamente polimórficos, permitem discriminações precisas, mesmo de indivíduos altamente

relacionados; 3) são abundantes e uniformemente dispersos em todo o genoma de plantas; 4) podem ser eficientemente analisados por PCR; 5) a informação do marcador, baseada nas sequências dos iniciadores, pode ser facilmente publicada e trocada entre laboratórios, melhorando os esforços cooperativos em pesquisa e desenvolvimento; 6) transferabilidade, ou seja, marcadores SSR podem ser usados em diferentes espécies, como exemplo alguns marcadores de tomate podem ser utilizados em pimentão.

As sequências de DNA que flanqueiam os SSRs são geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie, permitindo a seleção de iniciadores específicos que amplificam via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Quando os microssatélites são individualmente amplificados, utilizando o par de iniciadores complementar às sequências únicas que os flanqueiam, eles apresentam polimorfismo pelo tamanho. Esta variação de tamanho dos produtos de PCR é consequência da ocorrência de diferentes números de unidades repetitivas dentro da estrutura do microssatélite (Morgante & Olivieri, 1993; Hancock, 1995; Cregan *et al.*, 1999; Ashkenazi *et al.*, 2001). Desse modo, vários alelos podem ser determinados para uma determinada população (Figura 1). Indivíduos homozigóticos possuem o mesmo número de repetições nos cromossomos homólogos, enquanto os indivíduos heterozigóticos possuem número de repetições diferentes nos dois homólogos. Portanto, o loco é definido pelo par de iniciadores e os vários alelos, pelo tamanho das bandas amplificadas (Figura 1). A diferença de tamanho entre os fragmentos de DNA amplificados pode ser detectada por eletroforese em géis de poliacrilamida ou sistema de capilares com detecção semi-automatizada, via laser de espectro de fluorescências em sequenciador automático de DNA.



Centenas de sequências de marcadores SSR estão disponíveis no sítio de Banco de Dados de marcadores do algodão (<http://www.cottonmarker.org/>).

## **8. Mapeamento genético e mapeamento de QTLs**

A base para a construção de mapas genéticos foi fundamentada em experimentos sobre ligação gênica realizados por Morgan (1910) e Sturtevant (1913), que sugeriram como medida da distância entre dois genes a frequência de recombinação (Coelho & Silva, 2002). Sturtevant (1913) sugeriu a utilização da frequência de recombinantes como uma medida de distância entre dois genes na construção de mapas genéticos, futuramente chamada de centiMorgan (cM). Uma unidade de centiMorgan equivale a aproximadamente 1% de recombinação quando os marcadores estão bastante próximos, ou podem diferir da porcentagem de recombinação quando estão mais distantes em vista da ocorrência de “crossing-over” duplo, triplo, etc. Diversas funções de mapeamento têm sido utilizadas na correção das distâncias calculadas em porcentagem de recombinação para a distância em centiMorgan (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Com base na frequência de recombinação é realizada uma análise para verificar a distribuição independente entre os locos segregantes e, assim identificar pares de características ligadas. Após essa etapa, os marcadores ligados são ordenados em grupos de ligação. A ordem linear dos marcadores dentro de cada grupo é deduzida da distância genética relativa a cada um em estimativas dois a dois (Ritter *et al.*, 1990). Outros métodos utilizando estimativas de máxima verossimilhança da frequência de recombinação entre os marcadores e algoritmos de ordenação rápida de um grande número de marcadores têm sido empregados para a construção de mapas com maior precisão. Existem disponíveis diversos programas computacionais com base no método da máxima verossimilhança, tais com Linkage 1 (Suiter *et al.*, 1983), Mapmaker

(Lander *et al.*, 1987), GMendel (Liu & Knapp, 1992), Joinmap (Stam, 1993), entre outros.

Assim como para outras espécies, o mapeamento genético de plantas requer alguns requisitos, como: i) escolha dos genitores com fenótipo contrastante em relação à característica de interesse, ii) polinização controlada entre os genitores com produção de uma progênie com tamanho mínimo e representativo de eventos meióticos, e iii) obtenção de centenas de marcadores com segregação mendeliana clássica. Ao se caracterizar um loco marcador é desejável que os marcadores moleculares sejam polimórficos, que não sofram seleção, sejam codominantes para que todos os possíveis alelos dos locos marcadores possam ser identificados e contêm maior informatividade que os dominantes.

As populações mais utilizadas em mapas genéticos são as populações obtidas por retrocruzamento, populações  $F_2$ , linhagens puras recombinantes (RIL – “Recombinant Inbred Lines”), linhagens de duplo-haploides e cruzamento entre indivíduos heterozigotos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A população  $F_2$ , em comparação com as outras populações, tem a vantagem de ser rapidamente gerada pela autofecundação do híbrido  $F_1$ . Outra vantagem é que ambos os gametas de cada indivíduo são informativos, fazendo com que a quantidade de informação disponível neste tipo de população seja o dobro daquela disponível em populações de retrocruzamentos. Por esse motivo e pelo fato de a população  $F_2$  possuir todas as possíveis combinações dos alelos parentais (AA, Aa, aa), esta população tem sido amplamente usada para mapeamento de ligação em plantas (Guimarães *et al.*, 2006).

As características de interesse econômico em plantas têm quase sempre um controle genético complexo, geralmente determinado por vários genes distribuídos por

todo o genoma e com forte interação com o ambiente. Estas características são chamadas de características quantitativas e os locos gênicos (ou regiões genômicas) associados com o seu controle são conhecidos como QTL (*Quantitative Trait Loci*), ou locos de característica quantitativa (Tanksley *et al.*, 1989). Geralmente são identificados por estratégias de mapeamento genético utilizando marcadores moleculares, que detectam diferença significativa entre o fenótipo em questão e a classe genotípica do marcador, sugerindo que a característica está ligada ao marcador (Tanksley, 1993). Muitos QTLs têm sido identificados e podem ser enquadrados em dois grupos de genes, os de maior efeito no fenótipo, que explicam um alto percentual da variação fenotípica, e os que controlam características de menor efeito no fenótipo, e que representam a maioria dos QTLs encontrados. Informações de mapa têm sido usadas para desenvolver sistemas de seleção indireta para fenótipos de grande dificuldade de análise (Ferreira, 2003), possibilitando a seleção assistida por marcadores através de marcadores fortemente ligados à característica de interesse. A eficiência da identificação e isolamento de genes de características quantitativas via mapeamento genético depende, entre outros fatores, da herdabilidade da característica, da disponibilidade de marcadores moleculares distribuídos ao longo do genoma, da análise de um grande número de indivíduos em diferentes gerações de populações segregantes e de ensaios experimentais que possibilitem a mensuração do fenótipo de interesse. Limitações nestes fatores afetam diretamente a potencial detecção de QTLs de pequenos efeitos (Young, 1999; Risch, 2000).

O mapeamento de QTLs consiste em se detectar uma associação entre o fenótipo em questão e o genótipo de marcadores. Marcadores são utilizados para dividir a população de mapeamento em classes genotípicas diferentes de acordo com os

genótipos do loco marcador. Em seguida, métodos estatísticos são utilizados para determinar se os indivíduos das diferentes classes genotípicas diferem significativamente, com respeito à característica sendo avaliada (Tanksley, 1993). Se há diferenças significativas, considera-se que os genes que controlam a característica em questão estão ligados ao loco marcador. Os testes de significância desses parâmetros são, geralmente, feitos pela razão de verossimilhança (LR) ou por Logarithm of odds (LOD score). Os valores de LR ou de LOD são estimados para cada posição do cromossomo e então plotados em gráficos, para facilitar a visualização.

A análise de associação entre marcadores pode ser feita de forma individualizada, ou seja, de um marcador por vez (regressão linear) que não requer o conhecimento prévio da posição do marcador no genoma. Porém, quando a distância entre os marcadores e o QTL é grande, há dificuldade em sua detecção (Haley & Knott, 1992; Tanksley, 1993). A análise simultânea de vários marcadores conjuntamente é conhecida como mapeamento de intervalo simples e de intervalo composto. Mapeamento de intervalo simples testa a possível presença de QTL em várias posições de um intervalo entre dois marcadores moleculares (Lander & Bolstein, 1989) por regressão linear ou estimativa de verossimilhança. O mapeamento de intervalo composto testa a associação entre marcadores com a característica de interesse em cada intervalo, porém o modelo leva em consideração as variâncias de outros QTLs pela inclusão dos coeficientes de regressão parcial de outros marcadores no modelo. O mapeamento de intervalo múltiplo (Kao *et al.*, 1999) é uma alternativa para mapeamento de vários QTLs conjuntamente, incluindo efeitos de epistasia e de múltiplos QTLs, para buscar, testar posições e verificar interações de vários QTLs, utilizando diferentes intervalos de marcadores simultaneamente. De posse da informação de múltiplos marcadores que flanqueiam

QTLs é possível estimar a localização e o efeito fenotípico de QTLs individuais com maior precisão (Wendel *et al.*, 2009).

## **9. Mapas genéticos em *Gossypium* spp.**

Vários mapas de ligação tendo como base diferentes tipos de marcadores moleculares já foram construídos e publicados para diversas espécies de plantas (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Collard *et al.*, 2005). Para o gênero *Gossypium* diversos mapas foram publicados.

Reinisch e colaboradores (1994) desenvolveram um mapa baseado em marcadores RFLP, utilizando uma população de 57 indivíduos F<sub>2</sub>, derivada de um cruzamento entre as espécies *G. hirsutum* x *G. barbadense*. Usando esta mesma população, Rong e colaboradores (2004) aumentou o mapa anterior, encontrando um total de 2.584 locos, utilizando nesse estudo outros marcadores, porém a maioria dos locos foram identificados pelos marcadores RFLP, tal mapa teve como objetivo entender a evolução e a estrutura do genoma do algodão alotetraploide. Devido às limitações dos marcadores RFLP, os trabalhos e pesquisas desenvolvidas na construção de mapas genéticos passaram a utilizar os marcadores baseados em PCR.

Nguyen e colaboradores (2004) desenvolveram um mapa genético baseado em marcadores microssatélites, utilizando uma população de 76 indivíduos provenientes de retrocruzamento BC1 [(*G. hirsutum* x *G. barbadense*) x *G. hirsutum*]. Nesse estudo foram mapeados 1.160 locos, com uma distância de mapa total de 5.519 cM, com um total de 466 marcadores microssatélites e distância média de 12 cM entre dois locos SSR, tal mapa oferece uma ampla cobertura do genoma do algodão. Em 2007 Yu e colaboradores construíram um mapa de ligação utilizando 186 plantas F<sub>2</sub> (*G. hirsutum* x

*G. barbadense*), tal mapa continha um total de 1.097 marcadores, sendo 697 marcadores SSR, e um total de 1.252 locos foram mapeados.

Nos últimos anos diversos mapas genéticos de algodão foram construídos, sendo que os marcadores SSR foram os mais utilizados para tal construção. A escolha por esse marcador é devido a sua codominância, transferibilidade e abundância. Gou e colaboradores (2007) foram os primeiros pesquisadores a construir um mapa genético do algodão abrangente utilizando marcadores SSR. Nessa pesquisa utilizou-se 138 plantas BC1 derivadas do cruzamento interespecífico [(*G. hirsutum* x *G. barbadense*) x *G. hirsutum*]. Um total de 1.790 locos foram mapeados em 26 grupos de ligação, com uma distância de mapa total de 3.425 cM, e uma distância média entre marcadores de 1,91 cM. Yu e colaboradores (2011) construíram um mapa contendo marcadores exclusivamente SSR. Nesse trabalho foram usadas 141 plantas BC1 [(*G. hirsutum* x *G. barbadense*) x *G. hirsutum*]. Um total de 1.458 marcadores foram identificados, desse total, 547 marcadores foram construídos pelos pesquisadores e 911 marcadores produzidos em pesquisas anteriores. Foram encontrados nos 26 cromossomos do algodão 2.316 locos, com uma distância de mapa total de 4.418 cM, e uma distância média entre marcadores de 1,91 cM.

Diversos mapas genéticos do algodão já foram publicados, e com isso, tem-se a disposição uma grande quantidade de marcadores SSR, que abrange todo genoma dessa cultura. Em uma pesquisa recente, Blenda e colaboradores (2012) construíram um mapa genético consenso de algodão tetraploide, utilizando como base seis mapas de algodão mais informativos provenientes do cruzamento intraespecífico de *G. hirsutum* x *G. barbadense*. Nesse mapa de alta densidade foram mapeados 8.254 locos derivados de 6.669 marcadores SSR, com uma distância de mapa total de 4.070 cM e uma média de 2

locos por cM. Tal pesquisa teve como objetivo indexar todos os marcadores SSR já publicados em um único mapa, identificar marcadores SSR redundantes e, com isso, produzir um mapa denso, que será usado como recurso para o mapeamento de QTLs, e usado para uma melhor compreensão da estrutura do genoma e evolução do algodão tetraploide.

### **10. Mapeamento de QTLs em *Gossypium***

Diversos estudos de mapeamento de QTLs já foram publicados para o gênero *Gossypium*. Uma grande quantidade de QTLs ligados à produção e qualidade da fibra em algodão (comprimento, resistência, uniformidade) foram identificados e mapeados por meio de marcadores moleculares (Ulloa & Meredith Jr 2000; He *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; QingZhi, 2013), sendo que a maioria desses QTLs foram encontrados em população F<sub>2</sub> tetraploide, derivada de um cruzamento interespecífico entre *G. hirsutum* x *G. barbadense*.

QTLs ligados à resistência a doenças causadas por fungo foram encontrados em algodoeiro. Du *et al.* (2004) encontraram um marcador SSR relacionado à resistência à murcha de *Verticillium*, tal marcador se encontra a uma distância de 13,1 cM do gene de resistência. Wang *et al.* (2008) detectaram três QTLs significativamente relacionados com a resistência a *V. dahliae*. Wang e colaboradores (2007) usando uma população F<sub>2</sub> tetraploide, derivada de um cruzamento interespecífico entre *G. hirsutum* x *G. barbadense*, identificaram nove QTLs, que estão associados à resistência à murcha de *Verticillium*. Zhang e colaboradores (2014) identificaram dois QTLs de grande efeito localizados no cromossomo 6 e 21 conferindo resistência ao fungo mencionado

anteriormente. Wang *et al.* (2006), encontraram dois marcadores (AFLP) próximo a um gene (Fov1) que confere resistência ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* raça 1.

Nos últimos anos, diversas pesquisas encontraram QTLs ligados à resistência ao nematoide das galhas (NG) (*M. incognita*). Pesquisas realizadas sobre resistência de algodão ao NG sugerem que apenas alguns genes, talvez dois genes principais, conferem tal resistência (Shepherd 1974; McPherson *et al.*, 1995, 2004; Zhou, 1999; Ynturi, 2005; Ynturi *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2010). Shen e colaboradores (2006) identificaram dois QTLs, um de grande efeito no cromossomo 11 (Mi-C11) e outro de menor efeito no cromossomo 7 (Mi<sub>1</sub>-C07), que conferiam resistência ao NG *M. incognita* raça 3. Nesse trabalho foram usadas duas populações F<sub>2</sub> tetraploide derivada de um cruzamento interespecífico entre *G. hirsutum* x *G. barbadense*, na qual a fonte de resistência ao nematoide provinha do acesso Auburn 623 (*G. hirsutum*). Nesse estudo foi identificado o marcador SSR CIR316, o qual está próximo ao QTL do cromossomo 11. Tal resultado está de acordo com McPherson *et al.* (2004), que relatam a presença de dois genes de resistência na cultivar resistente M-315, um deles dominante derivado do acesso Auburn 623 (gene Mi-C11) no cromossomo 11 e o outro recessivo que seria derivado da cultivar moderadamente resistente Clewewilt 6-1 (Mi-C07) no cromossomo 7 (Shen *et al.*, 2006). Ynturi e colaboradores (2006) identificaram marcadores microssatélites associados a genes que conferem resistência a *M. incognita*, para serem usados em seleção assistida. Nesse estudo foram usadas 86 plantas F<sub>2</sub>, derivadas do cruzamento de duas linhagens isogênicas, sendo uma resistente e a outra suscetível (estas linhagens derivaram do cruzamento do acesso resistente Auburn 634, com o acesso suscetível Stoneville 213). Os autores desse trabalho sugeriram que a resistência ao nematoide era proveniente de pelo menos dois genes localizados nos cromossomos

11 e 14, e que os marcadores SSR BNL 3661, 3544, e 3645 estão próximos ao gene locado no cromossomo 14; e o marcador BNL 1231 está próximo ao gene do cromossomo 11.

### **11. Nematóide das galhas: virulência e patogenicidade**

A agressividade reflete a habilidade do nematóide de se reproduzir em bons ou maus hospedeiros e a virulência é a habilidade que o nematóide possui de se reproduzir em hospedeiros com genes de resistência. Em relação à virulência, existe a interação de genes de avirulência com genes de resistência que são respectivos no parasita e no hospedeiro (Hussey & Janssen, 2002). Relatos de virulência em *Meloidogyne* spp. são exemplificados com o gene de resistência *Mi* em tomate. Em 1950 houve a ocorrência de quebra de resistência por isolados de *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica*, os quais foram designados “raças-B” (Riggs & Winstead, 1959). Além do desenvolvimento de virulência em condições seletivas, a quebra de resistência em populações de campo também foi observada, mesmo quando elas não foram previamente expostas a cultivares resistentes. Experimentos de seleção em condições de laboratório mostraram que a proporção de nematoides virulentos aumentou gradualmente após cada geração sucessiva em plantas de tomate resistente (Netscher, 1977). Uma vez que *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica* são espécies que se reproduzem obrigatoriamente por partenogênese mitótica, outros mecanismos de recombinação genética devem ser responsáveis pelo aumento da virulência nessas populações (Hussey & Janssen, 2002). Recentemente foi relatado por Muniz *et al.* (2009) a quebra de resistência do cafeeiro ‘IAPAR 59’, portador do gene de resistência Mex- 1 por uma população de campo de *M. exigua*, proveniente de Bom Jesus de Itabapoana-RJ, que foi altamente virulenta à essa cultivar, sem prévia exposição a cultivares resistentes. Relatos de eventos de quebra da resistência em populações naturais de

nematóides demonstram a capacidade do patógeno de desenvolver mecanismos de adaptação a genes de resistência, em caso de uso contínuo da mesma fonte de resistência ou não (Castagnone-Sereno, 2002). A seleção de populações virulentas de *M. incognita* após sucessivos plantios de algodoeiros resistentes ocorreu na Califórnia (Ogallo *et al.*, 1997) e Texas (Zhou *et al.*, 2000). Nesses casos, isolados do nematoide, com maiores níveis de reprodução no cultivar resistente NemX foram encontrados em campos previamente plantados com essa fonte de resistência. A identificação de fontes múltiplas de resistência, que podem ser usadas em rotação ou piramidação de genes, torna-se dessa forma ainda mais importante.

## **12. Cultivares de algodoeiros resistentes ao nematoide das galhas**

Há poucos cultivares de algodoeiros resistentes ao nematoide das galhas com bom potencial de produção e boa qualidade de fibra. Nos EUA, as únicas cultivares comerciais de algodão resistentes ao nematoide das galhas disponíveis são Acala NemX e Stoneville 5599BR (adaptadas às áreas de produção da região Oeste), Paymaster 1560 e Stoneville LA887 (adaptados à região Sul) (Starr *et al.*, 2007). Ressalta-se entretanto, que com exceção da cultivar Acala NemX, que apresenta nível moderado de resistência e continua sendo utilizada pelos produtores de algodão da Califórnia, as demais são consideradas cultivares obsoletas em razão das suas características agronômicas não atenderem aos padrões de produtividade e qualidade do mercado atual. A cultivar Acala NemX proporcionou maior rendimento em áreas com moderada a alta infestação com *M. incognita* e suprimiu as densidades populacionais do nematoide (Ogallo *et al.*, 1997).

Além das cultivares comerciais, várias linhagens altamente resistentes foram disponibilizadas, incluindo algodoeiros Auburn 623 RNR (*G. hirsutum*), resultante do

cruzamento entre Clevevilt 6 e Wild Mexican Jack Jones (Shepherd, 1974), e Auburn 634 RNR, desenvolvido a partir do cruzamento Auburn 623 RNR × Auburn 56. A linhagem Auburn 634 RNR foi utilizada para desenvolver a série da linhagem-M (M-120 RNR, M315 RNR, etc) de genótipos resistentes (Shepherd, 1982). Linhagens resistentes, incluindo LA RN 4-4 e LA RN 1032 e a cultivar lançada Stoneville LA 887, foram desenvolvidos a partir de cruzamentos provenientes de Clevevilt 6 como o provável doador de resistência (Robinson *et al.*, 2001). Na Califórnia, Acala NemX (Oakley, 1995) e Acala NemX HY (Anonymous, 2005) foram lançados, com a resistência derivada da linhagem N6072 para a qual a fonte original da resistência não é conhecida (Hyer & Jorgenson, 1984; Oakley, 1995; Robinson *et al.*, 2001).

Em síntese, existem três principais fontes de resistência ao nematoide de galhas em algodoeiro. A fonte de resistência moderada da cultivar Acala Nem X que é de origem desconhecida; a resistência moderada da cultivar Stoneville LA887 que é oriunda do acesso Clevevilt 6, enquanto que o alto nível de resistência do acesso Auburn 623 RNH é oriundo da segregação transgressiva do cruzamento entre dois acessos moderadamente resistentes, Clevevilt 6 e Wild Mexican Jack Jones (Robinson *et al.*, 2001). As bases genéticas da resistência e as relações entre essas fontes ainda não foram claramente esclarecidas.

Quanto aos relatos de cultivares resistentes no Brasil, Carneiro *et al.* (2005) avaliaram seis genótipos de algodoeiro disponibilizados pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e selecionados em condições de campo quanto à resistência a *M. incognita* raça 3. Entre os genótipos avaliados, IAC 20-233 e IAC 20 RR-98/409 foram considerados moderadamente resistentes, enquanto que IAC 96/414 apresentou resistência ao patógeno. Considerando a origem genética da resistência dos genótipos

do IAC, pode-se verificar que todos se originaram da cultivar americana Auburn 56. Segundo Edivaldo Cia (informação pessoal), essa cultivar foi introduzida e estudada no Brasil por volta de 1958 e tem sido usada como fonte de resistência genética ao complexo *Fusarium* sp. X *M. incognita* (Fusnem), com bons resultados. As cultivares IAC 17, IAC 20 e as mais recentes IAC 23 e IAC 24 foram também originadas através de seleção genealógica de Auburn 56. Porém, a cultivar Auburn 56 é considerada obsoleta nos programas de melhoramento nos EUA por apresentar resistência apenas intermediária ao complexo Fusnem (Shepherd, 1982, 1983), e há muitos anos foi substituída por outras fontes de resistência, tais como as oriundas da Auburn 623 e 624, que apresentam altos níveis de resistência a *M. incognita*, embora não sejam usadas comercialmente por serem agronomicamente inferiores (Koenning *et al.*, 2001). Almeida *et al.* (2009a), testaram a cultivar IPR 140, lançada em 2007 a partir da linhagem PR 94-227-9/18 que posteriormente se transformou na cultivar IPR 120, a qual apresentou ótimos resultados em relação à resistência múltipla às principais doenças do algodoeiro. A seleção inicial foi feita em 2000, com ênfase no potencial produtivo e resistência/tolerância a *Rotylenchulus reniformis*. A linhagem estabilizada foi avaliada em múltiplos ambientes frente a testemunhas regionais e outras cultivares e linhagens nos estados do Paraná, São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Bahia. Esta cultivar destacou-se principalmente frente a nematoides, fusariose, mancha angular, alternariose e virose. Esses mesmos autores estudaram o comportamento da cultivar IPR Jataí (Almeida *et al.*, 2009b) que foi obtida por seleção genealógica em população híbrida resultante de cruzamento, entre genitores de base genética australiana, de um lado, e americana, de outro. A estabilização deste genótipo foi desenvolvida em condições de ocorrência de Fusnem. De maneira geral, evidencia-se

que essa cultivar destacou-se frente às mesmas doenças citadas para a cultivar IPR-140. Outro relato de resistência foi apresentado por Goldfarb *et al.* (2003), que avaliaram 23 linhagens do programa de melhoramento da Embrapa Algodão e três cultivares quanto à reação a *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* associado a *M. incognita* raça 3. Dessa forma, IAC-23 e as linhagens CNPA GO 31 2000-130 e CNPA GO 2000-1148 destacaram-se quanto à resistência ao parasitismo por *M. incognita*, estimada com base no número de massa de ovos, como também pela ausência de sintomas de murcha e infecção por *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

Acessos de *Gossypium* spp. recentemente identificados foram resistentes a um isolado brasileiro de *M. incognita* raça 3, de Londrina, estado do Paraná (Mota *et al.*, 2012), sendo assim, esses acessos apresentam ser novas fontes de resistência. Uma das possíveis novas fontes de resistência encontrada por Mota e colaboradores (2012) é o acesso Algodão del Pais nº3 (*G. barbadense*), este acesso apresentou resistência similar ao acesso M-315 (genótipo usado como padrão de resistência no trabalho dos autores citados), o qual é referido como resistente em vários trabalhos (Zhou *et al.*, 2000). Análise genética do acesso M-315 (derivado de Auburn 634 RNR), indica que sua resistência é derivada de dois genes (Jenkins *et al.*, 1995). Comparando os resultados de Mota *et al.* (2012) com os resultados de Jenkins *et al.* (1995), que estudaram a expressão da resistência no algodoeiro M-315 (*G. hirsutum*), pode-se inferir que o acesso Algodão del Pais nº 3, possui, no mínimo, dois genes de resistência; o primeiro de ação inicial ligado à reação de hipersensibilidade e o segundo mais tardio ligado à degeneração dos J3/J4 e à má formação das células gigantes. McPherson *et al.* (2004) evidenciaram dois mecanismos de resistência no acesso M-315, porém a ação de um dos mecanismos encontrados na M-315 difere do segundo mecanismo observado no

Algodão del Pais n° 3. Assim, acredita-se que o acesso M-315 e o acesso Algodão del Pais n° 3, apresentam pelo menos um gene diferente que confere resistência ao nematoide *M. incognita* raça 3.

## Literatura citada

Abawi, G.S. & J, Chen. 1998. Concomitant pathogen and pest interactions. p 135-158. In K.R. Barker, G. A. Pederson, & G.L. Windham (ed.) Plant and Nematode Interactions, Agron. Monogr. 36. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI.

Abrapa. Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Disponível em <<http://www.abrapa.com.br/estatisticas/Paginas/Algodao-no-Mundo.aspx>>. Acesso em 10/06/2014

Almeida, W.P.; Pires, J.R.; Ruano, O.; Turkiewicz, L.; Yamaoka, R.S.; Santos, W.J.; Marur, C.J.; Mehta, Y. R.; Costa, A.; Cia, E.; Oliveira, A.B. & Lüders, R.R 2009a. Cultivar com resistência/tolerância aos nematoides *Rotylenchulus reniformis* e *Meloidogyne incognita*. VII Congresso Brasileiro do Algodão, Foz do Iguaçu, PR. pp.1606.

Almeida, W.P.; Pires, J.R.; Ruano, O.; Turkiewicz, L.; Yamaoka, R.S.; Santos, W.J.; Marur, C.J.; Mehta, Y.R.; Costa, A.; Cia, E.; Oliveira, A.B. & Lüders, R.R. 2009b. Cultivar com resistência/tolerância a nematoides. VII Congresso Brasileiro do Algodão, Foz do Iguaçu, PR. pp 1414

Anonymous. 2005. Plant variety protection certification no. 200500113 for cotton Acala NemX HY. Plant Variety Protection Office, Agricultural Marketing Service, US Department of Agriculture, Washington, DC.

Anwar. S.A., ZIA, A., Hussain, M. And Kamran, M., 2007. Host suitability of selected plants to *Meloidogyne incognita* in the Punjab, Pakistan. Int. J. Nematol., 17: 144-150

Aquino DF. 2004. O Algodão no Brasil. In: Revista Atualidades agrícolas. p. 11.

Ashkenazi, V.; Chani, E.; Lavi, U.; Levy, D.; Hillel, J. & Veilleux, R.E. 2001. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. Genome, v.44, p.50-62.

Asmus, G.L. 2004. Ocorrência de nematóides fitoparasitos em algodoeiro no estado de Mato Grosso do Sul. Nematologia Brasileira, 28 (1): 77 - 86.

Beltrão, N.E.M. 1999. O agronegócio do Algodão no Brasil. Brasília: Embrapa – CTT/EMBRAPA-CNPA. 2:55

Beltrão, N.E.M. & Araújo, A.E. 2004. Algodão: o produtor pergunta, a Embrapa responde Embrapa Algodão. – Brasília, DF: Embrapa Informações tecnológicas 256p. : Il. Color. ; - (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

Beltrão, N.E.M. & Azevedo, D.M.P. 2008. O agronegócio do algodão no Brasil. 2ª Ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.

Blenda, A.; Fang, D.D.; Rami, J.F.; Garsmeur, O.; Luo, F. & Lacape, J.M. 2012. A High Density Consensus Genetic Map of Tetraploid Cotton That Integrates Multiple Component Maps through Molecular Marker Redundancy Check. PLoS ONE. 7(9): e45739. doi:10.1371/journal.pone.0045739

Blok, V.C.; Phillips, M.S.; Mcnicol, J.W. & Fargette, M. 1997. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs. Fundamental and Applied Nematology 20:127-133.

Brondani, R.P.V.; Brondani, C.; Tarchini, R. & Grattapaglia, D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucaliptus grandis* and *E. urophylla*. Theoretical and Applied Genetics, v.97, p.816-827.

Brubaker, C.L.; Bourland, F.M. & Wendel, J.F. 1999. The origin and domestication of cotton. In: Smith CW, Cothren JT. Cotton: origin, history, technology and production. New York: John Wiley and Sons. pp. 1-172.

Buainain, M.A & Batalha, M.O. 2007. Cadeia produtiva do algodão. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura. Brasília : IICA : MAPA/SPA. 110 p.

Brunel, D.A. 1994. Microsatellite marker in *Helianthus annuus* L. Plant Molecular Biology, v. 24, p. 297-400.

Carneiro, R.M.D.G.; Almeida, M.R.A. & Carneiro, R.G. 1996. Enzyme phenotypes of Brazilian isolates of *Meloidogyne* spp. *Fundamental and Applied Nematology* 19:555-560.

Carneiro, R.M.D.G.; Almeida, M.R.A. & Quénéhervé, P. 2000. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology* 2:645-654.

Carneiro, R.M.D.G.; Castagnone-sereno, P. & Dickson, D. 1998. Variability among four populations of *Meloidogyne javanica* from Brazil. *Fundamental and Applied Nematology* 21:319-326.

Carneiro, R.M.D.G.; Carneiro, R.G.; Neves, D.I.N. & Almeida, M.R.A. 2003. Nova raça de *Meloidogyne javanica* detectada em *Arachis pintoii* no estado do Paraná. *Nematologia Brasileira* 27:219-222.

Carneiro, R.M.D.G.; Santos, M.F.A.; Almeida, M.R.A.; Mota, F.C.; Gomes, A.C.M.M. & TIGANO, M.S. 2008. Diversity of *Meloidogyne arenaria* using morphological, cytological and molecular approaches. *Nematology* 10:819-834.

Carneiro, R.M.D.G.; Carneiro, R.G.; Neves, D.I.N. & Almeida, M.R.A. 2003. Nova raça de *Meloidogyne javanica* detectada em *Arachis pintoii* no estado do Paraná. *Nematologia Brasileira* 27:219-222.

Carneiro, R. M. D. & Almeida, M. R. A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécie. *Nematologia Brasileira*, 25:35-44.

Carneiro, R.M.D.G.; Neves, D.I.; Falcão, R.; Paes, N.S.; Cia, E. & Sá, M.F.G. 2005. Resistência de genótipos de algodoeiro a *Meloidogyne incognita* raça 3: Reprodução e histopatologia. *Nematologia Brasileira* 29(1): 1-10.

Carneiro, R.M.D.G.; Tigano, M.S.; Randig, O.; Almeida, M.R.A. & Sarah, J.L. 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology* 6:287-298.

Castagnone-Sereno, P. 2002. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes? *Euphytica* 124:193-199.

Castagnone-Sereno, P. 2006. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. *Heredity* 96:282–289.

Castagnone-Sereno, P.; Bongiovanni, M. & Dalmasso, A. 1993b. Stable virulence against the tomato resistance Mi gene in the parthenogenetic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology* 83:803–805.

Castagnone-Sereno, P.; Piotte, C.; Abad, P.; Bongiovanni, M. & Dalmasso, A. 1991. Isolation of a repeated DNA probe showing polymorphism among populations. *Journal of Nematology*, 23:316-320.

Castagnone-Sereno, P.; Piotte, C.; Uijthof, J.; Abad, P.; Wajnberg, E.; Wanlerberghe-Massutti, F.; Bongiovanni, M. & Dalmasso, A. 1993a. Phylogenetics relationships between amphimictic and partenogenetic nematodes of the genus *Meloidogyne* as inferred from repetitive DNA analysis. *Heredity*, 70:195-204.

Castagnone-Sereno, P.; Semblat, J. P. & Castagnone, C. 2009. Modular architecture and evolution of the map-1 gene family in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Genetics and Genomics* 282:5:547-554

Castagnone-Sereno, P.; Wanlerberghe-Massutti, F. & Leroy, F. 1994. Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. *Genome* 37:904-909.

Cenis, J.L. 1993. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by Random Amplified Polymorphic DNA (TAPD-PCR). *Phytopathology* 83:76-78.

Cia, E.; Fuzatto, M.G; Pizzinatto, M.A.; Pettinelli Júnior, A.; Paulo, E.M.; Zimback, L.; Silva, M.A.; Bortoletto, N & Vasconcelos, A.S.A. 1999. Comportamento de novas cultivares e linhagens na presença de doenças que ocorrem na cotonicultura da região meridional do Brasil. In: II Congresso Brasileiro de Algodão, Ribeirão Preto. Anais. EMBRAPA/CNPA. p. 441-443.

Cofcewicz, E.T.; Carneiro, R.M.D.G.; Castagnone-Sereno, P. & Quénéhervé, P. 2004. Enzyme phenotypes and genetic diversity of root-knot nematodes parasitising *Musa* in Brazil. *Nematology* 6: 85-95.

Cofcewicz, E.T.; Carneiro, R.M.D.G.; Randig, O.; Chambrier, C. & Quénéhervé, P. 2005. Diversity of *Meloidogyne* spp. on *Musa* in Martinique, Guadeloupe and French Guiana. *Journal of Nematology* 37: 313-322.

Conab. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>. Acesso em 10/06/2014

Collard, B.C.Y.; Jahufer, M.Z.Z.; Brouwer, J.B & Pang, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, v. 142, p. 169-196.

Concibido, V.C.; Young, N.D.; Lange, D.A.; Denny, R.L.; Danesh, D. & ORF, J.H. 1996. Target comparative genome analysis and qualitative mapping of major partial-resistance gene to the soybean cyst nematode. *Theoretical Applied Genetics*, v.93, p.234-241.

Correa, V.R.; Santos, M.F.A.; Almeida, M.R.A.; Peixoto, J.R.; Castagnone-Sereno, P. & Carneiro, R.M.D.G. 2013a. Species-specific DNA markers for identification of two root-knot nematodes of coffee: *Meloidogyne arabicida* and *M. izalcoensis*. *European Journal of Plant Pathology*. Volume 137, Issue 2, pp 305-313.

Correa, V.R.; Mattos, V.S.; Almeida, M.R.A.; Santos, M.F.A.; Tigano, M.S.; Castagnone-Sereno, P. & Carneiro, R.M.D.G. 2013b. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* and development of a species-specific SCAR marker for its diagnosis. *Plant Pathology*. doi: 10.1111/ppa.12108

Cregan, P.B.; Jarvik, T.; Bush, A.L.; Shoemaker, R.C.; Lark, K.G.; Kahler, A.L.; Kaya, N.; Vantoai, T. T.; Lohnes, S.D.G.; Chung, J. & Specht, J.E. 1999. Na integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Science*, v.39, p.1464-1490.

- Curran, J.; Macclure, M.A. & Webster, J.M. 1986. Genotypic differentiation of *Meloidogyne* populations by detection of restriction fragment length difference in total DNA. *Journal of Nematology* 18: 83-86.
- Curtis, R.H.C.; Robinson, A.F. & Perry, R.N. 2009. Hatch and host location. *In*: Perry, R.N.; Moens, M.; Starr, J.L. *Root Knot Nematodes*. Wallingford, UK, CABI Publishing p. 139-162.
- Davis, R.F. and R.C. Kemerait. 2009. The multi-year effects of repeatedly growing cotton with moderate resistance to *Meloidogyne incognita*. *J. of Nematology* 41: 140-145.
- Dekkers, J.C.M. & Hospital, F. 2002. The use of molecular genetics in their provement of agricultural populations. *Nature reviews genetics*, v. 3, n. 1, p. 22-32.
- De Ley, P. & Blaxter, ML. 2002. Systematic position and phylogeny. *In*: Lee, D.L (ed.). *The Biology of Nematodes*. Taylor and Francis, London, p. 1-30.
- Du, W.S.; Du, X.M. & Ma, Z.Y. 2004. Studies on SSR markers of resistance gene of *Verticillium wilt* in cotton. *J Northwest Sci Tech Univ Agri and For* 3: 20–24.
- Eisenback, J.D. 1983. Loss of resistance in tobacco cultivar ‘NC95’ by infection of *Meloidogyne arenaria* or *M. hapla*. *Journal of Nematology*, 15, 478.
- Eisenback, J.D. & Triantaphyllou, H.H. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. and races. *In*: Nickle, W.R (ed.) *Manual of agricultural nematology*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, p. 191-274.
- Elliott, C.L; Lewis, S; Mueller, J.D. 1998. Galling of South Carolina *Meloidogyne incognita* populations on resistant cotton genotypes. *Proceedings* (1): 145-146
- Esbenshade, P.R. & Triantaphyllou, A.C. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). *Journal of Nematology* 17: 6-20.

Fang D. D & Yu J. Z. 2012. Addition of 455 Microsatellite Marker Loci to the High Density Gossypium hirsutum TM-1 x G. barbadense 3-79 Genetic Map. The Journal of Cotton Science 16:229–248

Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª edição. Embrapa. Brasília-DF

Ferreira, M.E. Melhoramento genético de arroz. 2003. impactos da genômica. In: Melhoramento Genômico. Eds. Borém, A., Giudice, M. & Sedyama, T. Universidade Federal de Viçosa. pp. 73-129.

Freitas, L.G.; Oliveira, R.D.L. & Ferraz, S. 2006. Introdução à Nematologia. 3ª edição. Ed. UFV. Viçosa-MG.

Fourie, H.; Zijlstra, C. & McDonald, H. 2001. Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique. Nematology, 3:675-680.

Goldfarb, M.; Amaral, F.V.; Morello, C.L.; Araújo, A.E.; Suassuna, N.D. 2003. Reação de genótipos de algodoeiro a Meloidogyne Incognita raça 3 associado a Fusarium oxysporum f. SP. Vasinfectum. In: IV Congresso Brasileiro de Algodão, 2003, Goiânia, GO.

Guo, W.; Cai, C.; Wang, C.; Han, Z.G.; Song, X.L, et al. 2007. A microsatellite-based, gene-enriched linkage map reveals genome structure, function, and evolution in Gossypium. Genetics 176: 527–541.

Guimarães, C.T.; Schuster, I.; Magalhães, J.V. de; Souza Jr, C.L. de. 2006. Marcadores Moleculares no Melhoramento de Plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T.. Marcadores Moleculares. Viçosa, MG: UFV. Cap. 4, p. 107-144.

Gutierrez, O.A.; Jenkins, J.N.; McCarty, J.C.; Wubben, M.J.; Hayes, R.; Callahan, F.E. 2010. SSR markers closely associated with genes for resistance to root-knot nematode on chromosomes 11 and 14 of Upland cotton. Theor Appl Genetics 121:1323–1337

- Haley, C.S. & Knott, S.A. 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using least squares. *Genetics*, 136:1195-1207.
- Hancock, J.M. 1995. The contribution of slippage-like processes to genome evolution. *Journal of Molecular Evolution*, v.41, p.1038–1047.
- Harris, T.S.; Sandall, L.J. & Powers, T.O. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Nematology* 22: 518-524.
- He, D.H.; Lin, Z.X.; Zhang, X.L.; Nie, Y.C.; Guo, X.P.; Zhang, X.Y & Li, W. 2007. QTL mapping for economic traits based on a dense genetic map of cotton with PCR-based markers using the interspecific cross of *Gossypium hirsutum* × *Gossypium barbadense*. *Euphytica* 153:181-197
- Hunt, D.J. & Handoo, Z.A. 2009. "Taxonomy, identification, and principal species". In Roland N. Perry, Maurice Moens & James L. Starr. *Root-knot Nematodes*. CAB International. pp. 55–97.
- Hussey, R.S. & Janssen, G.J.W. 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Starr, J.L.; Cook R.; Bridge, J. *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. CAB International, Wallingford. pp. 43-70.
- Hutchinson, J.B. 1951. Intra-specific differentiation in *Gossypium hirsutum*. *Heredity*. 5:163-193.
- Hyer, A.H & Jorgenson, E.C. 1984. Root-knot nematode resistance in cotton breeding: Techniques and results. In: *Proceedings Beltwide Cotton Conferences, National, Cotton Council of America, Memphis, TN*, pp. 377–379.
- Ide, M.A. 2000. Experiências no manejo de nematoides na cultura do algodoeiro. In: *Congresso Brasileiro de Nematologia*. Uberlândia. pp. 30-31.
- Inomoto, M.M. 2001. Algodão: atacado por nematoides. *Revista Cultivar*. 3 (30): 5-7.

Jeffers, D.P & Roberts, P.A. 1993. Effect of plant date and host genotype on the root-knot – *Fusarium* wilt disease complex of cotton. *Phytopathology* 83:645-654.

Jenkins, J.N.; Creech, R.G.; Tang, B.; Lawrence, G.W. & McCarty, J.C. 1995. Cotton resistance to root-knot nematode : II. Post-penetration development. *Crop Science* 35:369-373.

Janssen, G.J.W.; Scholten, O.E.; Van Norel, E. & Hoogendoorn, C.J. 1998. Selection of virulence in *Meloidogyne chitwoodi* to resistance in the wild potato *Solanum fendleri*. *Eur J Plant Pathol* 104: 645–651.

Jones, C.J.; Edwards, K.J.; Castaglione, S.; et al. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3:381-390

Kao, C.H.; Zeng, Z.B & Teasdale, R.D. 1999. Multiple Interval Mapping for Quantitative Trait Loci. *Genetics*, v.152, n.3, p. 1203-1216.

Karssen, G. & Moens, M. 2006. Root-knot nematodes. *In*: Perry, R.L.; Moens, M. (eds.) *Plant Nematology*. Cambridge, MA, USA, p. 59-90.

Kirkpatrick, T.L & Rothrock, C.S. 2001. *Compendium of Cotton Diseases*. Kirkpatrick TL, Rothrock CS (Eds), St Paul, Minnesota, USA. The American Phytopathological Society. pp. 68-72.

Koenning, S.R.; Barker, K.R. & Bowman, D.T. 2001. Resistance as a tactic for management of *Meloidogyne incognita* on Cotton in North Carolina. *Journal of Nematology* 33(2- 3):126-131.

Lander, E.S.; Green, P.; Abrahamson, J.; Barlow, A.; Daly, M.J.; et al. 1987. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, v.1, p.174-181.

Lander, E. S. & Botstein, D. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, v.121, p.185-199.

Lewin, B. 2001. *Genes VII*. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001. 955p.

- Litt, M. & Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, v.44, p.398:401.
- Liu, D.H & Knapp, S.J. 1992. Gmendel 2.0: a software for gene mapping. Oregon State University.
- Lubbers, E.L. & Chee, P.W. 2009. The worldwide gene pool of *G. hirsutum* and its improvement. In: Paterson AH (Ed.) *Plant genetics and genomics: crops and models: Genetics and Genomics of Cotton*. New York: Springer. pp. 23-52.
- Maggenti, A. 1981. *General Nematology*. New York: Springer-Verlag Mccouch, S.R.; Chen, O.; Panaud, S.; Temnykh, Y.; Xu, Y.G.; Cho, N.; Huang, T.; Ishii, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in Rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology*, v.35, p.89-99.
- Mclain, D.K.O.; RAI, K.S. & Fraser, J.M. 1987. Intraespecific and interspecific variation in the sequence and abundance of highly repeated DNA among mosquitos of the *Aedes albopictus* subgroup. *Heredity* 58: 373-381.
- McPherson, R.G.; Jenkinsm, J.N.; McCarty, J.C & Watson, C.E. 1995. Combining ability analysis of root-knot nematode resistance in cotton. *Crop Sci* 35:373–375
- McPherson, G.R.; Jenkins, J.N.; Watson, C.E. & McCarty, J.C. 2004. Inheritance of root-knot nematode resistance in M315 RNR and M78 RNR cotton. *J Cotton Sci* 8:154–161
- McPherson, R.G.; Jenkins, J.N.; Watson, C. & McCarty, J.C. 2004. Inheritance of root-knot nematode resistance in M-315 RNR et M78-RNR cotton. *Journal of Cotton Science* 8:154-161.
- Meng, Q.P.; Long, H. & Xu, J.H. 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. *Acta Phytopathologica Sinica* 34:204–10.

- Mienie, C.M.S.; Fourie, H.; Smit, M.A.; Van Staden, J. & Botha, F.C. 2002. Identification of AFLP markers in soybean linked to resistance to *Meloidogyne javanica* and conversion to sequence characterized amplified regions (SCARs). *Plant Growth Regulation* 37:157-166
- Moens, M.; Perry, R. & Starr, J. 2009. *Meloidogyne* species- a diverse group of novel and important plant parasites. Pp. 483 *In*: Perry, R. N.; Moens, M.; Starr, J. L. (eds). *Root-knot nematodes*, 1. Wallingford, UK
- Mojtahedi, H.; Santo, G.S. & Wilson, J.H. 1988. Host tests to differentiate *Meloidogyne chitwoodi* races 1 and 2 and *M. hapla*. *Journal of Nematology* 20:468-473.
- Morgante, M. & Olivieri, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, v.3, p.175-182.
- Mota, F.; Alves, G.; Giband, M.; Gomes, A.; Sousa, F.; Mattos, V.; Barbosa, V.; Barroso, P.; Nicole, M & Peixoto, J. 2012. New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defence mechanisms. *Plant Pathol.* doi:10.1111/ppa.12022.
- Muniz, M.F.S.; Campos, V.P.; Moita, A.W.; Gonçalves, W.; Almeida, M.R.A.; Sousa, F.R.; et al. 2009. Reaction of coffee genotypes to different populations of *Meloidogyne* spp.: detection of a naturally virulent *M. exigua* population. *Tropical Plant Pathology*, 34, 370-378.
- Muniz, M.F.S.; Campos, V.P.; Castagnone-Sereno, P.; Castro, J.M.C.; Almeida, M.R.A. & Carneiro, R.M.D.G. 2008. Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. *Nematology* 10: 897-910.
- Netscher, C. 1977. Observations and preliminary studies on the occurrence of resistance breaking biotypes of *Meloidogyne* spp. on tomato. *Cahiers ORSTOM Series Biologie* 11:173-178.
- Nguyen, T.B.; Giband, M.; Brottier, P.; Risterucci, A.M. & Lacape, J.M. 2004. Wide coverage of tetraploid cotton genome using newly developed microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 109: 167–175.

- Noir, S.; Anthony, F.; Bertrand, B.; Combres, M.C. & Lashermes, P. 2003. Identification of a major gene (Mex-1) from *Coffea canephora* conferring resistance to *M. exigua* in *Coffea arabica*. *Plant Pathology* 52:97-103.
- Oakley, S.R. 1995. CPCSD Acala C-225: A new nematode-resistant Acala variety for California's San Joaquin Valley. In: Proceedings Beltwide Cotton Conferences, National Cotton Council of America. Memphis, TN, pp. 39.
- Ogallo, J.L.; Goodell, P.B.; Eckert, J. & Roberts, P.A. 1997. Evaluation of NemX, a new cultivar of cotton with high resistance to *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 29(4): 531-537.
- Ogtr (Office of the Gene Technology Regulator). The biology and ecology of cotton (*Gossypium hirsutum*) in Australia. 2002. Disponível em <<http://www.agbios.com/docroot/decdocs/06-059-003.pdf>>. Acesso em: Out. 2013
- Orion, D. & Kritzman, G. 1991. Antimicrobial activity of *Meloidogyne javanica* gelatinous matrix. *Nematologica* 14:481-483.
- Paran, I. & Michelmore, R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 985-993.
- Percival, A.E.; Wendel, J.F. & Stewart, J.M. 1999. In: Smith CW, Cothren JT (Eds.) *Cotton: origin, history, technology and production*. New York: John Wiley and Sons. pp. 33-64.
- Percy, G.R. 2009. The worldwide gene pool of *G. barbadense* and its improvement. In: Paterson AH (Ed.) *Plant genetics and genomics: crops and models: genetics and genomics of cotton*: New York: Springer. pp. 53-68.
- Percy, R.G & Wendel, J.F. 1990. Allozyme evidence for the origin and diversification of *Gossypium barbadense* L. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin. 79(4):529-542.

- Powers, T.O.; Todd, T.C.; Burnell, A.M.; Murray, P.C.B.; Fleming, C.C.; Szalanski, A.L.; Adams, B.A. & Harris, T.S. 1997. The r DNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology* 29: 441-450.
- Rammah, A. & Hirschmann, H. 1990. Morphological comparison of three host races of *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 22: 56-68.
- Randig, O.; Bongiovanni, M.; Carneiro, R.M.D.G. & Castagnone-Sereno, P. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome* 45: 862-870.
- Reinisch, A. J.; Dong, J.; Brubaker, C.L.; Stelly, D.M.; Wendel, J.F. & Paterson, A.H. 1994. A detailed RFLP map of cotton, *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense* chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome. *Genetics* 138:829-847
- Riggs, R.D. & Winstead, N.N. 1959. Studies on resistance in tomato to root-knot nematodes and on the occurrence of pathogenic biotypes. *Phytopathology* 49:716-724.
- Ritter, E.; Gebhardt, C & Salamini, F. 1990. Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics*, v.125, p.645-654.
- Risch, N.J. 2000. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, 405 15:847-856.
- Roberts, P. A. 1992. Current status of the availability, development, and use of host plant resistance to nematodes. *Journal of Nematology* 24:213-227.
- Roberts, P.A. 2002. Concepts and Consequences of Resistance. In: Starr, J.L.; Cook, R.; Bridge, J. (eds) *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. CAB International, Wallingford. pp. 25-41.

Roberts, P.A.; Frate, C.A.; Matthews, W.C. & Osterli, P.P. 1995. Interactions of virulent *Meloidogyne incognita* and Fusarium wilt on resistant cowpea genotypes. *Phytopathology* 85:1288–1295.

Roberts, P. A. & Thomason, I. J. 1989. A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. *Agricultural Zoology Reviews* 3:225–252.

Robinson, A.F.; Bowman, D.T.; Cook, C.G.; Jenkins, J.N.; Jones, J.E.; May, L.O.; Oakley, S.R.; Oliver, M.J.; Roberts, P.A.; Robinson, M.; Smith, C.W.; Starr, J.L. & Stewart, J.M. 2001. Nematode resistance. p.68-79 T.L. Kirkpatrick and C.S. Rothrock, (ed.) *Compendium of Cotton Diseases*. APS Press, St. Paul, MN

Rong, J.K.; Abbey, C.; Bowers, J.E.; Brubaker, C.L.; Chang, C.; P.W.; et al. 2004. A 3347-locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*). *Genetics* 166:389–417.

Ruano, O.; Carneiro, R.G.; Brito J.A.; Silva, J.F & Juliatti, F.C. 1997. Algodão (*Gossypium hirsutum*) - Doenças causadas por nematoides. In: Vale FXR, Zambolim L. (Ed.) *Controle de doenças de plantas- grandes culturas*. Viçosa: Departamento de Fitopatologia 2: 583-603

Santos, M.F.A.; Furlanetto, C.; Carneiro, M.D.G.; Almeida, M.R.A.; Mota, F.C.; Gomes, A.C.M.M.; Silveira, N.O.R.; Silva, J.G.P.; Castagnone-Sereno, P.; Tigano, M. S. & Carneiro, R.M.D.G. 2012. Biometrical, biological, biochemical and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species. *European Journal of Plant Pathology* 134:671–684.

Sasser, J.N. 1954. Identification and host-parasite relationships of certain root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). College Park, Maryland Agricultural Experiment Station. 31p. (Technical Bulletin, A-77).

Sasser, J.N. 1980. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease* 64:36-41.

- Schuster, I.; Abdelnoor, R.V.; Marin, S.R.R.; Carvalho, V.P.; Kiihl, R.A.S.; Silva, J.F.V.; Sedyama, C.S.; Barros, E.G & Moreira, M.A. 2001. Identification of a new major QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). Theoretical and Applied Genetics, v.102, p.91-96.
- Semblat, J.P.; Wajnberg, E.; Dalmasso, A.; Abad P. & Castagnone-Sereno, P. 1998. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. Molecular Ecology 7:119-125.
- Semblat, J.P.; Rosso, M.N.; Hussey, R.S.; Abad, P. & Castagnone-Sereno, P. 2001. Molecular cloning of a cDNA encoding an amphid-secreted putative avirulence protein from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Molecular Plant-Microbe Interactions 14:72-79.
- Silva, R.V. 2005. Produção de inóculo e diferenciação de raças de *Meloidogyne exigua* em *Coffea* spp. Dissertação de Mestrado. . Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, Brasil.
- Shepherd, R.L. 1974. Transgressive segregation for root-Knot nematode resistance in cotton. Crop Science 14:872-875.
- Shepherd, R.L. 1982. Genetic resistance and its residual effects for control of the root-knot nematode – Fusarium Wilt complex in cotton. Crop Science 22:1151-1155.
- Shepherd, R.L. 1983. New sources of resistance to root-knot nematodes among primitive cottons. Crop science 23:999-1002.
- Shen, X.; Van Becelaere, G.; Kumar, P.; Davis, R.F.; May, L.O.; et al. 2006. QTL mapping for resistance to root-knot nematodes in the M-120 RNR Upland cotton line (*Gossypium hirsutum* L.) of the Auburn 623 RNR source. Theor Appl Genet 113: 1539–1549.
- Stam, P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Joinmap. The Plant Journal, v.5, p.739-744.

Starr, J.L.; Koenning, S.R.; Kirkpatrick, T.L.; Robinson, A.F.; Roberts, P.A & Nichols, R.L. 2007. The future of nematode management in cotton. *Journal of Nematology* 39:283-294.

Starr, J.L.; Moresco, E.R.; Smith, C.W.; Nichols, R.L.; Roberts, P.A. & Chee, P. 2010. Inheritance of Resistance to *Meloidogyne incognita* in Primitive Cotton Accessions from Mexico *Journal of Nematology* 42(4):352-8

Starr, J.L. & Page, L.J. 1993. Nematode parasites of cotton and other tropical fiber crops. In: Luc, M., R.A. Sikora & Bridge, J. (Ed.). *Plant Parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford. CAB International. pp. 539-556.

Stuber, C.W.; Goodman, M.M & Moll, R.H. 1982. Improvement of yield and ear number resulting from selection at allozyme loci in a maize population. *Crop Science*, v.22, n.4, p.737-740.

Suiter, K.A.; Wendel, J.F.; Case, J.S. 1983. Linkage-1: a Pascal computer program for the detection and analysis of genetic linkage. *The Journal of Heredity*, v.74, n.3, p.203-204.

Tanksley, S. D. 1993. Mapping polygenes. *Annual Reviews of Genetics*, v. 27, p. 205-233.

Tanksley, S.D.; Young, N.D.; Paterson, A.H. & Bonierbale, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Biotechnology*, 7: 257-264.

Taylor, A. L. & Sasser, J. N. 1978. *Biology, Identification and Control of Root-Knot Nematodes (Meloidogyne species)*. Raleigh. North Carolina State University.

Taylor, D.T. & Sasser, J.N. 1983. *Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (Meloidogyne species)*. North Carolina State University and USAID.

Triantaphyllou, A.C. 1985. Cytogenetics, cititaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. In: Carter, C.C.; Sasser, J. N. (eds.). *An advanced treatise on Meloidogyne*, vol. I, Biology and control. Raleigh, North Carolina State University Graphics. p. 113 – 126.

Triantaphyllou, A.C. 1987. Genetics of nematode parasitism on plants. *In*: Veech, J.A.; Dickson d. (eds). *Vistas on Nematology*. Society of Nematologists, Hyattsville (MD) EUA, p. 354-363.

Ulloa, M. & Meredith, R.J. 2000. Genetic linkage map and QTL analysis of agronomic and fiber quality traits in an interspecific population. *Cotton Sci* 4: 161-170 Jones JE, Wright SL, Newsome LD (1958) Sources of tolerance to and inheritance of resistance to root-knot nematodes in cotton. *In*: 11th Annual cotton improvement conference, December 15–16, 1958, Houston, TX, USA. National Cotton Council of America, Memphis, TN, pp 34–39

Veech, J.A. & Starr, J.L. 1986. Comparison of development, reproduction and aggressiveness of *Meloidogyne incognitaraces* 3 and 4 on cotton. *Journal of Nematology*. 18:413–415

Wang, F.R.; Liu, R.Z.; Wang, L.M.; Zhang, C.Y.; Liu, G.D.; et al. 2007. Molecular marker of *Verticillium* resistance in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivar and their effects on assisted phenotypic selection. *Cotton Sci* 6:424–430.

Wang, X., Yu, Y., Sang, J., Wu, Q., Zhang, X., Lin, Z. 2013. Intraspecific linkage map construction and QTL mapping of yield and fiber quality of *Gossypium babardense*. *Australian Journal of Crop Science AJCS* 7(9):1252-1261

Wang, H.M.; Lin, Z.X.; Zhang, X.L.; Chen, W.; Guo, X.P.; et al. 2008. Mapping and quantitative trait loci analysis of *Verticillium* wilt resistance genes in cotton. *J Integr Plant Biol* 2:174–182.

Wendel, J.F. & Albert, V.C. 1992. Phylogenetics of the Cotton genus (*Gossypium*): character-state weighted parsimony analysis of chloroplast-DNA restriction site data and its systematic and biogeographic implications. *Systematic Botany*, Wyoming. 17(1): 115-143

Wendel, J.F.; Brubaker, C.; Alvarez, I.; Cronn, R & Stewart, J.M. 2009. Evolution and natural history of the cotton genus. *In*: Paterson AH (Ed.). *Plant genetics and genomics: crops and models: genetics and genomics of cotton*. New York: Springer. pp. 03-22.

- Westengen, O.T.; Huamán, A. & Heun, M. 2005. Genetic diversity and geographic pattern in early South America cotton domestication. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin.110(2):392-402.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535.
- Wofford, D.S.; Gray, F.A. & Eckert, J.W. 1989. Pathogenicity of two populations of *Meloidogyne hapla* Chitwood on alfalfa and sainfoin. *Journal of Nematology* 21:87-91.
- Xu, Y. & Crouch, J.H. 2008. Marker-Assisted Selection in Plant Breeding: From Publications to Practice. *Crop Science*, 48:391-407.
- Young, N.D. A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding *Molecular Breeding* 5: 505-510, 1999.
- Yu, J.; Yu, S.; Lu, C.; Wang, W.; Fan, S.; et al. 2007. High-density linkage map of cultivated allotetraploid cotton based on SSR, RAPD, SRAP and AFLP markers. *J Integr Plant Biol* 49: 716–724.
- Yu, Y.; Yuan, D.; Liang, S.; Li, X.; Wang, X.; et al. 2011. Genome structure of cotton revealed by a genome-wide SSR genetic map constructed from a BC1 population between *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*. *BMC Genomics* 12: 15.
- Ynturi, P. 2005. Phenotypic and genotypic study of root-knot nematode resistance in near isogenic lines of cotton. Thesis, Mississippi State University, Mississippi State, MS
- Ynturi, P.; Jenkins, J.N.; McCarty, J.C.; Gutierrez, O.A. & Saha, S. 2006. Association of root-knot nematode resistance genes with simple sequence repeat markers on two chromosomes in cotton. *Crop Sci* 46:2670–2674
- Zhang, K.; Zhang, J.; Ma, J.; Tang, S.Y.; Liu, D.J.; Teng, Z.H.; Liu, D.X.; Zhang, Z.S. 2012. Genetic mapping and quantitative trait locus analysis of fiber quality traits using a three-parent composite population in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Mol Breeding* 29:335-348

Zhang, X.; Yuan, Y.; Wei, Z.; Guo, X.; Guo, Y.; et al. 2014. Molecular Mapping and Validation of a Major QTL Conferring Resistance to a Defoliating Isolate of Verticillium Wilt in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). PLoS ONE 9(4): e96226. doi:10.1371/journal.pone.0096226

Zhang, Y.; Lin, Z.X.; Xia, Q.; Zhang, M. & Zhang, X.L. 2008. Characteristics and analysis of simple sequence repeats in the cotton genome based on a linkage map constructed from a BC1 population between *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*. Genome 51:534–546

Zijlstra, C. 2000. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR–PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. European Journal of Plant Pathology 106:283-290.

Zijlstra, C.; Uenk, B.J. & Van Silfhout, C.H. 1997. A reliable precise method to differentiate species of root-knot nematodes in mixtures on the basis of ITS-RFLPs. Fundamental and Applied Nematology 20:59-63.

Zijlstra, C.; Donkers-Venne, D.T.H.M. & Fargette, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified regions (SCAR) based PCR assays. Nematology, 2:847-853

Zhou, E. 1999. Resistance to *Meloidogyne incognita* in cotton genotypes. Dissertation, Texas A & M University, College Station, T.X.; Zhou, E.; Starr, J.L. & Smith, C.W. 1999. Inheritance of resistance to *Meloidogyne incognita* in the cotton cultivar Acala NemX. J Nematol 31:584–585

Zhou, E.; Wheeler, T.A. & Starr, J.L. 2000. Root galling and reproduction of *Meloidogyne incognita* isolates from Texas on resistant cotton genotypes. Journal of Nematology 32(4S): 513-518.

# CAPÍTULO 2

---

---

**VARIABILIDADE GENÉTICA E VIRULÊNCIA DE POPULAÇÕES  
DE *Meloidogyne incognita* A GENÓTIPOS RESISTENTES DE  
ALGODOEIRO (*Gossypium* ssp.)**

## **Variabilidade genética e virulência de populações de *Meloidogyne incognita* a genótipos resistentes de algodoeiro (*gossypium* ssp.)**

### **RESUMO**

O nematoide das galhas *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, 1949 é um dos mais importantes patógenos na cultura do algodão (*Gossypium* spp.), além de ser amplamente distribuído. Os objetivos deste estudo foram avaliar a variabilidade genética entre populações brasileiras de *M. incognita* e agressividade/virulência dessas populações em diferentes cultivares de algodoeiro. Cinco isolados de *M. incognita* e um isolado de *M. enterolobii* (outgroup) foram utilizados nas análises moleculares. Os resultados mostraram que apenas 2,7% dos fragmentos de DNA foram polimórficos. Apesar da existência de duas raças (raças 3 e 4) e dois fenótipos de esterase (I1 e I2), foi observada uma baixa variabilidade genética entre os isolados, o que pode ser devido ao modo de reprodução partenogenético mitótico do patógeno. A agressividade/virulência entre os isolados em relação a diferentes genótipos de algodoeiros também foi estudada. Nenhuma das populações foi virulenta aos genótipos de algodoeiros resistentes M-315 RNR, TX-25, CIR1343, Wild mexicano Jack Jones e CIR1348, que apresentaram FR <1.0. Duas populações de *M. incognita* dos estados de Mato Grosso do Sul e Paraná (Umuarama) (raças 4 e 3, respectivamente) foram altamente agressivas em relação ao controle suscetível FM966 e virulentas para os acessos LA-887 e Clewewilt-6 que mostraram resistência moderada a outras populações testadas.

**Palavras- chaves:** agressividade, marcadores moleculares, nematoides das galhas.

## **Genetic variability and virulence of *Meloidogyne incognita* populations to resistant cotton genotypes (*Gossypium* spp.)**

### **ABSTRACT**

The root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, 1949 is widely distributed and a major pathogen of cotton (*Gossypium* spp.) worldwide. The objectives of this study were to assess the genetic variability and aggressiveness/virulence among Brazilian populations of *M. incognita* in cotton. Five isolates of *M. incognita* and one isolate of *M. enterolobii* (outgroup) were used in the molecular analyses. Our results showed that only 2.7% of the fragments of DNA were polymorphic. Despite the existence of two races (races 3 and 4) and two esterase phenotypes (I1 and I2), a low genetic variability among isolates was observed, which might be due to the mitotic parthenogenetic mode of reproduction of this pathogen. The aggressiveness/virulence among isolates towards different cotton genotypes was also studied. None of the populations was virulent to the resistant cotton genotypes M-315 RNR, TX-25, CIR1343, Wild Mexican Jack Jones and CIR1348, that presented  $RF < 1.0$ . Two populations of *M. incognita* from the states of Mato Grosso do Sul and Paraná (Umuarama) (races 4 and 3, respectively) were highly aggressive to the susceptible control FM966 and virulent to the accessions LA-887 and Cleve-wilt-6 that showed moderate resistance to the other populations tested.

**Keywords:** aggressiveness, molecular markers, root-knot nematode

## 1. INTRODUÇÃO

O nematoide das galhas (RKN) *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, 1949 é um importante patógeno do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) em áreas produtoras em todo o mundo (Starr *et al.*, 2005), causando danos diretos e aumentando a incidência e a severidade de outras doenças, em particular, da fusariose, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder-Hans (Jeffers & Roberts, 1993; Abawi & Chen, 1998). As raças 3 e 4 desse patógeno são capazes de parasitar o algodoeiro nos EUA (Veech & Starr, 1986) e no Brasil.

O controle mais eficiente para o nematoide das galhas é através da utilização de variedades resistentes que ajudam a controlar a doença e manter o rendimento da cultura, enquanto diminuem a população de nematoides presentes no solo, protegendo assim os próximos cultivos (Ruano *et al.*, 1997; Davis & Kemeraït, 2009). No entanto, a exposição contínua de variedades resistentes a nematoides pode induzir o aparecimento de isolados capazes de quebrar a resistência, o que pode ocorrer em algumas gerações (Netscher, 1977, Janssen *et al.*, 1998). Além do desenvolvimento de virulência em condições experimentais, observou-se quebra de resistência em campo, inclusive, em populações não expostas anteriormente a cultivar resistente (Roberts & Thomason, 1989). As espécies partenogênicas do gênero *Meloidogyne* apresentam uma elevada capacidade de responder à seleção ambiental, além disso, sua capacidade de superar os genes de resistência de plantas tem sido demonstrada (Roberts, 1995; Castagnone-Sereno, 2002, Castagnone-Sereno, 2007). Grande parte das informações sobre virulência em *Meloidogyne* spp. está relacionada com o gene *Mi* de resistência em tomateiro (Roberts 1992, Roberts 1995) ou genótipos de feijão caupi com o gene de resistência Rk (Roberts *et al.*, 1995). No algodão, a seleção de isolados com elevada

reprodução em variedades resistentes tem sido demonstrada (Ogallo *et al.*, 1997). Resistência com base na implantação de um único ou poucos genes pode ser mais propensa à quebra de resistência. Atualmente, o melhoramento genético do algodão resistente ao nematoide de galhas depende de um número reduzido de fontes de resistência, com apenas um pequeno número de genes envolvidos (Robinson *et al.*, 2001; McPherson *et al.*, 2004, Starr *et al.*, 2010). Além disso, a variabilidade na virulência de isolados desse gênero em genótipos de algodão resistentes tem sido relatada (Elliott *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2000; Anwar & McKenry, 2007). Esses resultados apontam para a necessidade de identificar novas fontes de resistência e aumentar o número de genes úteis. Eles também apontam para a necessidade de melhor documentar a extensão da variabilidade da agressividade ou virulência das populações de *Meloidogyne* de diferentes regiões produtoras de algodão em relação aos genótipos resistentes e tolerantes.

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular tem aberto novas perspectivas para a identificação de espécies e para o estudo da variabilidade intra-específica de *Meloidogyne* spp. (Castagnone-Sereno *et al.*, 1991, 1993). Marcadores moleculares neutros, como RAPD, AFLP e ISSR, foram usados para analisar a diversidade de espécies de *Meloidogyne* (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Semblat *et al.*, 1998; Randig *et al.*, 2002; Fargette *et al.*, 2005; Carneiro *et al.*, 2004; 2008; Muniz *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2012; Correa *et al.*, 2013). No algodão, os estudos sobre a variabilidade da agressividade ou virulência entre populações de *Meloidogyne* ainda são escassos (Elliott *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2000; Anwar & McKenry, 2007) e, não estão disponíveis relatos sobre a extensão da variabilidade genética de isolados de *M. incognita* nessa cultura. Nossa equipe relatou acessos de

*Gossypium* spp. recentemente identificados e que foram altamente resistentes a um isolado brasileiro de *M. incognita* raça 3, de Londrina-PR (Mota *et al.*, 2012) e, que representam novas fontes de resistência ao nematoide das galhas em algodão. O presente estudo teve como objetivo estudar a variabilidade genética de populações de *M. incognita* coletadas em áreas de produção de algodão através dos marcadores moleculares neutros RAPD, ISSR e AFLP e analisar a reação de genótipos de algodoeiros quanto à resistência ou suscetibilidade às populações de *M. incognita* coletadas em áreas produtoras de algodão

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Identificação de espécies e raças do nematoide**

Cinco populações de *M. incognita* patogênicas ao algodoeiro (*Gossypium* spp.) foram obtidos a partir de plantios de algodão de diferentes regiões do Brasil (Tabela 1). Essas populações foram identificadas por meio dos perfis de esterase (EST) e malato-desidrogenase (MDH) de acordo com protocolo de Carneiro & Almeida (2001). As raças de *M. incognita* foram determinadas de acordo com o método apresentado por Hartman & Sasser (1985). Uma população de *M. enterolobii* foi utilizada como *outgroup* na análise da diversidade genética.

**Tabela 1.** Populações de *Meloidogyne* spp. de diferentes regiões do Brasil utilizadas no estudo.

Espécie/Raça	Código da população	Origem geográfica	Fenótipos <sup>1</sup>	
			Est	Mdh
<i>M. incognita</i> Raça 4	MT- R4	Campo Verde - MT	I2	N1
<i>M. incognita</i> Raça 3	PR-R3 (LON)	Londrina - PR	I1	N1
<i>M. incognita</i> Raça 3	PR-R3 (UMU)	Umuarama - PR	I2	N1
<i>M. incognita</i> Raça 3	MTS-R3	Dourados - MS	I2	N1
<i>M. incognita</i> Raça 3	BA-R3	Luís Eduardo Magalhães - BA	I2	N1
<i>M. enterolobii</i>	MENT	Petrolina - PE	VS1-S1	N1 a

<sup>1</sup>Est =Esterase, Mdh=Malato desidrogenase.

## 2.2 Extração de ovos e preparação de DNA

A obtenção de ovos para posterior extração de DNA seguiu o protocolo descrito por Carneiro *et al.* (2004).

Após três meses em casa de vegetação, as raízes dos tomateiros foram lavadas cuidadosamente, cortadas e trituradas em liquidificador com hipoclorito de sódio (NaOCl) 1,25% por 1 minuto. Em seguida, o triturado foi passado em peneiras sobrepostas de 32, 100 e 500 mesh. Os resíduos da peneira de 500 mesh foram lavados com água corrente e coletados em béquer.

A suspensão coletado foi distribuída em tubos de 15 ml, aos quais adicionou-se caulim (aproximadamente uma colher de chá ou 5 gramas) em cada tubo e esses foram centrifugados a 360 g por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e uma solução de sacarose 30% foi adicionada e misturada. A suspensão foi então centrifugada na mesma velocidade por dois minutos. Em seguida, o sobrenadante foi vertido em peneira de 500 mesh e lavado com água destilada para retirar os resíduos de sacarose. Os ovos retidos na peneira de 500 mesh foram transferidos para tubos de 15

ml, o volume do tubo foi completado com água destilada e esses foram centrifugados por três minutos a 360 g. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma micropipeta. Os ovos foram transferidos para tubos Eppendorf de 1,5 ml e centrifugados a 9300 g por 3-4 minutos para eliminar o restante de água antes de armazenar o material a -80°C para posterior extração do DNA genômico. O DNA genômico de todas as populações de nematoides foi extraído de 200 a 300 µl de ovos, de acordo com o método descrito por Randig *et al.* (2002). Os ovos previamente extraídos e armazenados a -80 °C foram macerados em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. Após o resfriamento, o material foi recuperado em tubo Eppendorf de 2 ml, ao qual foi adicionado 500 µl de tampão NIB (0,1 M NaCl; 30 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA; 0,7 mM β mercaptoetanol; 5 mM Triton - NPHO). Efetuada a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 14.000 g por dois minutos e eliminado o sobrenadante. Esta operação de lavagem foi efetuada duas vezes. Em seguida, foram acrescentados 800 µl de tampão de homogeneização (0,1 M NaCl; 0,2 M sacarose; 10 mM EDTA) e 200 µl do tampão de lise (0,125 M EDTA; 0,5 M Tris pH 9,2; 2,3 % SDS).

Após a homogeneização, as amostras foram incubadas a 55 °C por 30 minutos, seguido de 10 minutos à temperatura ambiente. A purificação foi realizada adicionando-se 1 V (1 ml) de fenol, seguindo-se à homogeneização e centrifugação a 14.000 g por três minutos. O sobrenadante foi recuperado e depois misturado à ½ V (500 µl) de fenol + ½ V (500 µl) de clorofórmio e centrifugado a 14.000 g por três minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 200 µl de éter. Após centrifugação a 14.000 g por três minutos, o éter foi eliminado com auxílio de uma micropipeta. Para precipitação do DNA, 1 ml de etanol absoluto foi adicionado ao tubo, efetuando-se a homogeneização e observando-se a formação do pellet. O material foi então incubado a -80 °C durante 30

minutos. Em seguida efetuou-se uma centrifugação a 14.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado etanol 70%. Após a centrifugação a 14.000 g por 5 minutos, eliminou-se o etanol. O precipitado foi seco à temperatura ambiente, recuperado em 10-20 µl de água esterilizada (Milli-Q) e armazenado a – 20 °C.

### **2.3 Técnica PCR-RAPD**

A técnica PCR-RAPD foi realizada num volume final de 13 µl, contendo: 3 µl de DNA total [3 ng/µl]; 0,4 µl do primer [10 µM] (Operon Technologies); 2 µl de dNTP [1,25 mM] (Invitrogen); 1,3 µl tampão 10X com MgCl<sub>2</sub> (Phonutria Biotecnologia e Serviços – Pht); 0,2µl da enzima Taq DNA polimerase (5U/ µl) (Pht) e 6,1 µl de água Milli-Q, no final, em cada reação foi adicionado um gota de óleo mineral. As amplificações foram realizadas em termociclador (PTC-100, MJ Research) programado nas seguintes condições: 5 min. a 94 °C, 40 ciclos de 30 seg. a 94°C, 45 seg. a 36°C, 2 min. a 70°C, e uma elongação final de 10 min. a 70°C (Randig *et al.*, 2002).

Os fragmentos amplificados com 22 primers RAPD foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5% (90 mM Tris-básico, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,3) a uma corrente constante de 100 mA por aproximadamente 3 horas e corado com brometo de etídio (0,3 µg/ml) e visualizados sob luz UV.

Foram utilizados os seguintes primers de RAPD (Operon Technologies) para este estudo: A18, B01, B06, B12, C09, D05, D13, D20, E18, G03, G05, J10, J19, K04, K07, K16, L08, M20, N10, P02, R04 e R07. A escolha dos primers foi aleatória.

## 2.4 Técnica PCR-ISSR

As reações de amplificação foram realizadas num volume de 13 µL contendo 9 ng de DNA genômico, utilizando as condições de PCR descritas por Carneiro *et al.* (2008). Nove primers ISSR (Integrated DNA Technologies) foram utilizados: (CA)<sub>8</sub>, (AC)<sub>8</sub>, (CCA)<sub>5</sub>, (CA)<sub>8</sub> CTCT T, (GT)<sub>8</sub>YA, (GACA)<sub>4</sub> e (GTC)<sub>6</sub>. Os produtos de amplificação foram separados por electroforese em gel de agarose a 1,5% como mencionado para os de RAPD.

## 2.5 Técnica PCR-AFLP

O protocolo deste experimento foi de acordo com Suazo & Hall (1999). O DNA genômico extraído dos ovos foi clivado por uma enzima de restrição (*EcoRI*). Adaptadores específicos foram ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Os adaptadores *EcoRI* (upper e lower) foram aquecidos a 95°C durante 5 min. no termociclador (PTC-100), e em seguida mantidos à temperatura ambiente durante cerca de 10 min.

A reação de ligação/digestão dos adaptadores ao DNA consistiu num volume final de 20 µl, contendo: 2µl de tampão 10X da T4 DNA ligase, 2 µl de NaCl 0,5M, 0,5 µl de BSA, 2µl dos adaptadores *EcoRI* (25 µM), 0,5µl de cada enzima *EcoRI* (12 U/µl), 1 µl da T4 DNA ligase (1 U/µl), 2µl de água Milli-Q, 10µl de DNA (100 ng/µl). Essa reação foi incubada a 37°C “overnight”. A partir de cada reação retirou-se 5 µl para corrida em gel de agarose 1,5% a fim de se conferir a digestão.

Após verificação da digestão de cada amostra, o restante da reação (15 µl) foi diluído a um volume de 150 µl para a realização das reações de PCR.

Do total de 150 µl, utilizou-se 1 µl do DNA digerido para cada reação. A reação de PCR com DNA digerido e ligado com adaptadores foi realizada em volume final de 25 µl, contendo: 1 µl de DNA total, 2,5 µl de tampão 10X, 1 µl de MgCl<sub>2</sub> [50 mM], 1 µl do primer [10 µM], 0,5 µl dNTP [10 mM], 0,3 µl da enzima Taq DNA polimerase (5 U/µl), 18,3 µl de água Milli-Q, cada reação foi coberta com óleo mineral para evitar evaporação. O termociclador (PTC-100) foi programado com as seguintes condições: 1 min. a 95 °C; 37 ciclos de 1 min. a 94 °C, 1 min. a 56 °C e 2 min. e 30 seg a 72 °C; e um ciclo de extensão final de 5 min. a 72 °C.

A subpopulação de fragmentos amplificados foi separada em gel de alta resolução 1,5 % agarose-synergel, sendo 0,7 % agarose e 0,4 % Synergel (Diversified Biotech Synergel™), a uma corrente constante de 100 mA por aproximadamente 3 horas. Para visualização, os géis foram corados com brometo de etídio (0,3 µg/ml) e visualizados sob luz UV. Uma série de treze primers foram utilizados (Integrated DNA Technologies), consistindo na sequência dos nucleotídeos do adaptador da *EcoRI* GACTGCGTACCAATTCAGT, seguida de mais três nucleotídeos aleatórios na terminação 3': AGT, TCA, ATT, GCG, CAG, TGG, CCT, ACC, CCG, CGA, CTC, CAT e CCG. Os produtos de amplificação foram separados por electroforese como descrito acima para os marcadores ISSR e RAPD. Os experimentos com os três tipos de marcadores foram realizados duas vezes.

## **2.6 Análises de polimorfismo**

Para cada tipo de marcador, os fragmentos amplificados foram registrados como presente ou ausente a partir das fotografias digitalizadas dos géis, e esses dados foram convertidos em uma matriz binária. A reconstrução filogenética foi realizada utilizando

o método filogenético UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), implementado no programa PAUP\* versão 4b10 (Swofford, 2002). Uma análise individual e outra combinada dos três marcadores foi realizada com 1000 repetições de bootstrap para testar a significância do dendrograma obtido. A correlação entre as matrizes de distância genética foram estimadas com o teste de Mantel com 10.000 permutações usando o programa IBDWS (Jensen *et al.*, 2005).

## **2.7 Genótipos de *Gossypium***

Acessos de *G. hirsutum* e *G. barbadense* utilizados neste estudo (Tabela 2) foram obtidos a partir do CIRAD ou das coleções de germoplasma da Embrapa. Estes genótipos foram previamente testados e mostraram-se moderadamente a altamente resistente a uma população de *M. incognita* raça 3 (Mota *et al.*, 2012). A cultivar FiberMax966 (FM966) foi utilizada como um controle susceptível, enquanto a cultivar M-315 foi utilizada como controle resistente.

**Tabela 2.** Descrição dos acessos de *Gossypium* spp. utilizados no estudo.

<b>Nome do acesso</b>	<b>Espécie</b>	<b>Origem do acesso</b>
CIR1348	<i>G. barbadense</i> race barbadense	Peru – wild accession; Cirad acesso n° CIR1348
Cleviewilt-6	<i>G. hirsutum</i>	USA – cultivar obsoleta com resistência moderada ao nematoide das galhas
Fibermax966(FM966)	<i>G. hirsutum</i>	Australia – variedade comercial
LA-887	<i>G. hirsutum</i>	USA – cultivar obsoleta com resistência ao nematoide das galhas
M-315 RNR	<i>G. hirsutum</i>	USA – linhagem altamente resistente ao nematoide das galhas
TX-25	<i>G. hirsutum</i> race punctatum	Mexico – acesso selvagem; NPGS PI n° 154035
CIR1343	<i>G. barbadense</i> race barbadense	Peru – acesso selvagem; Cirad acesso n° CIR1343
Wild Mexican Jack Jones (WMJJ)	<i>G. hirsutum</i>	Mexico – acesso selvagem; USDA acesso TX-2516, NPGS PI n° 593649

## **2.8 Inóculo do nematoide**

Quatro populações de *M. incognita* raça 3, e uma população da raça 4 coletadas em diferentes estados do Brasil (Tabela 1) foram utilizadas neste estudo. Antes da inoculação, as populações foram multiplicadas em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L., cv. Santa Clara) por 3 meses em casa de vegetação. Os ovos foram extraídos a partir de raízes infectadas usando hipoclorito de sódio a 0,5% de acordo com Boneti & Ferraz (1981). A contagem foi feita usando um microscópio de luz e lâmina de Peters.

## **2.9 Avaliação de resistência ao nematoide**

Seis plantas de cada um dos genótipos de algodão foram cultivadas em vasos (20 x 15 cm) preenchidos com uma mistura (1:1) de solo autoclavado e composto Bioplant® e foram mantidas a 25-30 °C em casa-de-vegetação. Quarenta dias após a emergência das plântulas, os algodoeiros foram inoculadas com 10.000 ovos de *M. incognita* em torno da base do caule com auxílio de uma pipeta. As plantas foram dispostas em um delineamento inteiramente casualizado em fatorial 8x5x1, com oito repetições, sendo que em cada bancada foram colocados as seis repetições dos oito genótipos e assim foram inoculadas com apenas uma população, para evitar a ocorrência de contaminação. As plantas foram regadas e adubadas quando necessário. Quatro meses após inoculação, as raízes foram lavadas e pesadas. As raízes foram coradas com floxina B e avaliados os índices de galhas e massas de ovos usando a escala: 0 = nenhuma galha ou massa de ovos; 1= 1-2 galhas ou massas de ovos, 2 = 3-10; 3 = 11-30; 4 = 31-100, 5= > 100 galhas ou massas de ovos (Hartman & Sasser, 1985).

Os ovos foram extraídos usando o método de extração modificado de Boneti & Ferraz (1981), utilizando 1% de hipoclorito de sódio. O fator de reprodução (FR) foi calculado como  $FR = PF / PI$ , em que PF = população final e PI = população inicial (= 10.000). As médias do FR foram transformadas em  $\log(x + 1)$ , submetidas à análise de variância e separadas pelo teste de Scott-Knot ( $P < 0,05$ ). Os acessos foram classificados como suscetíveis (S), moderadamente resistentes (MR) ou resistentes (R) de acordo com a análise de variância e os conceitos de Oostenbrink (1966) e Starr & Mercer (2009). O experimento foi repetido duas vezes.

### **3. RESULTADOS**

#### **Caracterização de populações de *Meloidogyne incognita***

Dois fenótipos de esterase foram reconhecidos entre as populações de *M. incognita* de algodão (Tabela 1). O fenótipo I1 com uma banda (Rm: 1,0), foi detectado na população de Londrina enquanto o fenótipo I2 com duas bandas, uma banda principal (Rm 1.1) e outra menor (Rm 1,2), foi detectado nas outras quatro populações. Não foi observada correlação entre o fenótipo de esterase e as raças. O fenótipo de malato desidrogenase N1 (Rm 1.0) foi detectado em todas as populações estudadas.

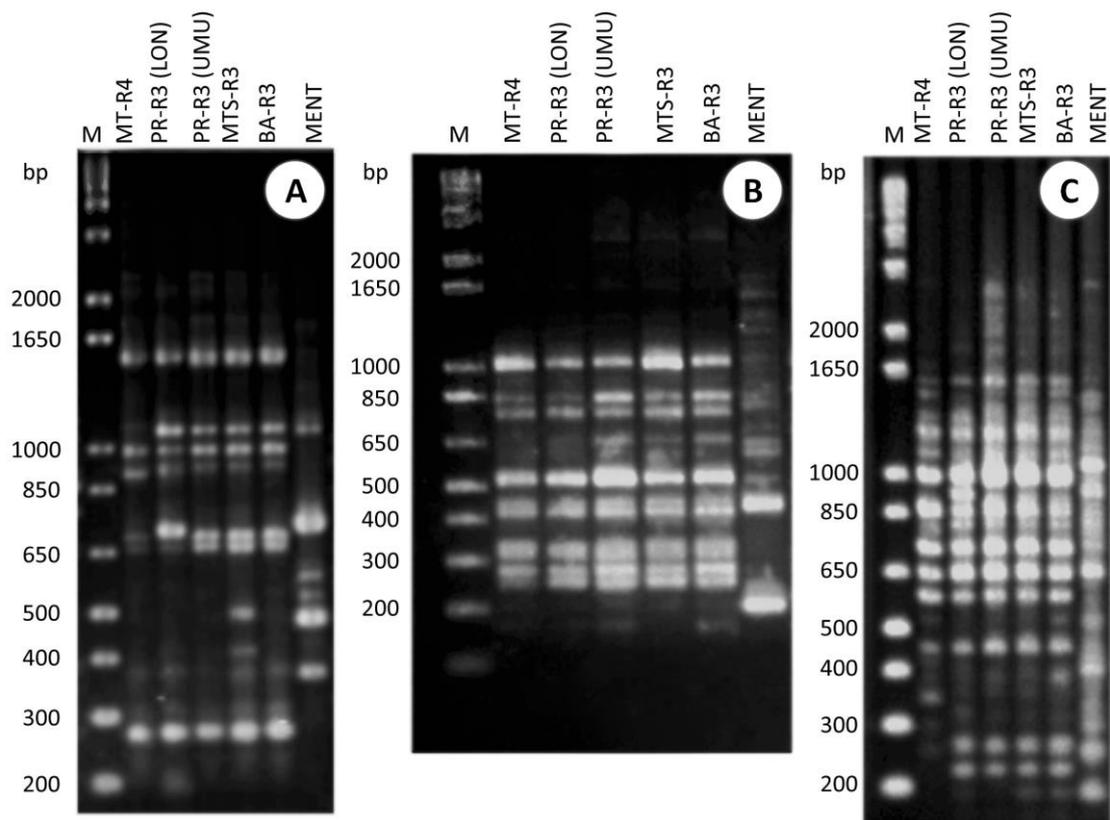
As cinco populações de *M. incognita* reproduziram em tomateiro 'Rutgers', melancia 'Charleston Gray', em pimentão 'California Wonder' e sobre o algodão "Deltapine 61 "; no entanto, houve variação na reação ao fumo resistente "NC95 "; a população 1 reproduziu em fumo e foi classificada como pertencente à raça 4, enquanto que as populações 2, 3, 4 e 5 não reproduziram, e foram atribuídas à raça 3.

## Diversidade genética

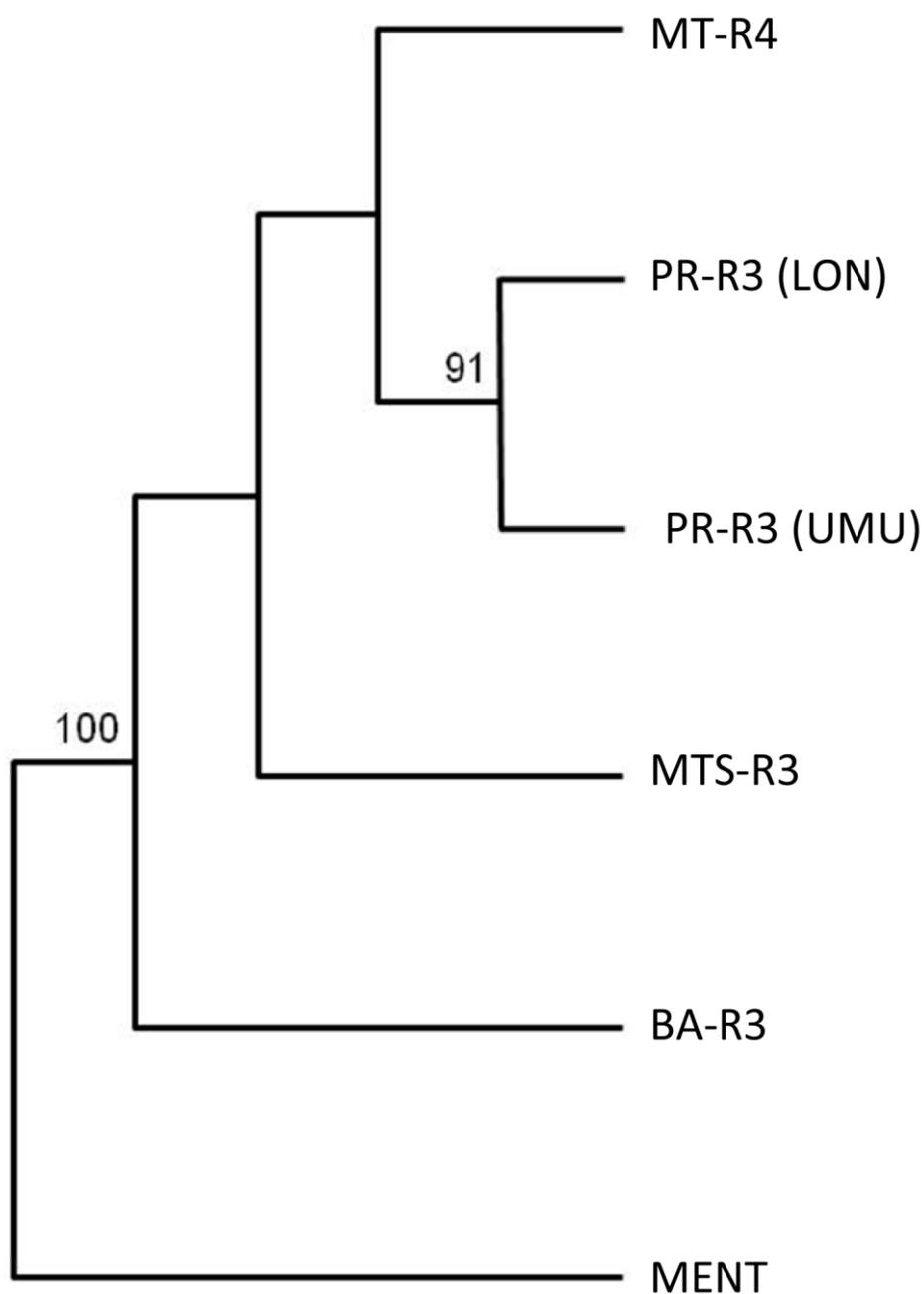
Todos os três marcadores foram capazes de produzir fragmentos para as populações de *Meloidogyne* testadas. Exemplos são mostrados na Figura 2. Um total de 331 fragmentos amplificados foram atribuídos às populações de *M. incognita*. O número de fragmentos variaram de 1-11/população e variavam em tamanho de 200 a 2.500 pares de bases (pb) para RAPD; 1-10/população e 150 a 2.500 bp para ISSR e 1-16/população e 180 a 2.500 pb para AFLP. No geral, apenas nove fragmentos (2,7%) foram polimórficos neste estudo. Nenhum dos nove primers ISSR testados apresentaram bandas polimórficas. Os primers que revelaram fragmentos polimórficos foram os de RAPD A18, D05, D13, D20, G05, e os de AFLP 08 5'-GACTGCGTACCAATTCAGTCCT-3' e 09 5'-GACTGCGTACCAATTCAGTACC-3'.

Todas as bandas amplificadas foram registradas para a construção de uma matriz de 0-1, sobre a qual foram feitas análises de agrupamento utilizando UPGMA. O dendograma resultante da análise conjunta dos dados de RAPD e AFLP é mostrado na Figura 2. As duas populações (raça 3) do Paraná se agruparam com bootstrap de 91%, no entanto, nenhum agrupamento geral das populações de acordo com as raças foi detectado.

A diversidade entre as populações de *M. incognita* do algodoeiro foi baixa. Uma correlação pequena, porém significativa entre as distâncias geográficas e genética foi observada através do teste de Mantel. A correlação foi positiva,  $R = 0,64$  ( $p < 0,05$ ), o que significa que as populações geograficamente mais próximas também tendem a ser geneticamente próximas, enquanto as populações geograficamente distantes tenderam a ser mais geneticamente divergentes.



**Figura 1:** Exemplo de padrões de amplificação das populações de *Meloidogyne* spp. gerados com primers RAPD G05 (A), ISSR 32 [(GA)<sub>6</sub>GG] (B) e AFLP 08 (GAC TGC GTA CCA CAG ATT T CCT) (C). M: marcador 1kb plus. Populações descritas na Tabela 1.



**Figura 2:** Dendrograma mostrando as relações entre as populações de *Meloidogyne* spp., através da análise conjunta dos marcadores RAPD e AFLP. Valores de bootstrap (> 50%) com base em 1000 repetições. Populações descritas na Tabela 1.

#### **Resistência de acessos de algodão a *Meloidogyne incognita* raças 3 e 4**

A resistência foi avaliada com base em três critérios: *i*- índice de galhas, *ii*- índice de massa de ovos e *iii*- fator de reprodução. Todas as populações de nematoides

testadas mostraram fatores de reprodução baixos ( $FR < 0,2$ ) para os acessos resistentes M-315 RNR (controle resistente), TX-25, CIR1348, CIR1343, Wild Mexican Jack Jones (Tabela 3). A formação de galhas e massas de ovos também foi reduzida nesses acessos de algodão (Tabela 4). Em contraste, o controle suscetível (FM966), exibiu números altos de galhas e massas de ovos, assim como altos fatores de reprodução para todas as populações (Tabelas 3 e 4). Os acessos Clevevilt-6 e LA-887, considerados moderadamente resistentes, apresentaram valores intermediários para os índices de galhas e massas de ovos quando analisados para as populações MTS-R3, BA-R3 e PR-R3 LON (Tabelas 3 e 4). Por outro lado, eles permitiram alta formação de galhas e massas de ovos, quando analisados para as populações MT-R4 e PR-R3 UMU (Tabelas 3 e 4) e, foram considerados suscetíveis a elas.

**Tabela 3.** Fatores de reprodução (FR) apresentados pelas cinco populações de *Meloidogyne incognita* raças 3 e 4 em acessos de algodoeiro selecionados.

Acessos de algodão <sup>1</sup>	População <sup>3</sup> /Reação <sup>2,4</sup>				
	MT- R4 <sup>3</sup>	MTS-R3	BA-R3	PR-R3 (UMU)	PR-R3 (LON)
TX-25	0,10 b R <sup>2</sup>	0,03 d R	0,01c R	0,04d R	0,13c R
CIR 1348	0,09 b R	0,05 d R	0,25c R	0,06d R	0,02c R
CIR1343	0,19 b R	0,07 d R	0,25c R	0,17d R	0,20c R
Wild Mexican Jack Jones	0,04 b R	0,10 d R	0,24c R	0,60d R	0,01c R
Clewevilt-6	57,61 a S	4,61bMR	5,10bMR	38,04bS	3,51b MR
LA-887	46,75 aS	1,69cMR	3,8b MR	19,36cS	1,10 bMR
M-315 RNR	0,07 b R	0,01 d R	0,04c R	0,02d R	0,04c R
Fibermax 966	56,51 a S	19,12 a S	36,71a S	70,69a S	26,25a S

<sup>1</sup> Acessos de algodão descritos na Tabela 2.

<sup>2</sup> Média dos valores ( 6 repetições) foram transformadas em log (x+1). Médias seguidas de letras diferentes nas colunas são significamente diferentes (P< 0.05) de acordo com o teste de Scott-Knot.

<sup>3</sup> *M. incognita* descritas na Tabela 1.

<sup>4</sup> S = Suscetível; MR = Moderadamente resistente; R = Resistente

**Tabela 4.** Médias dos índices de galhas (IG) e massas de ovos (IMO) de cinco populações de *Meloidogyne incognita* raças 3 e 4 em acessos de algodoeiro selecionados.

Acessos <sup>1</sup>	Populações <sup>2</sup>									
	MT- R4		MTS-R3		BA-R3		PR-R3 (UMU)		PR-R3 (LON)	
	IG <sup>3</sup>	IMO <sup>3</sup>	IG	IMO	IG	IMO	IG	IMO	IG	IMO
TX-25	2,7	0	0,7	0	2,1	0	1,2	0	3,0	0,2
CIR 1348	1,8	0	0	0	1,5	0	2,3	0	0,3	0
CIR1343	2,5	1,5	1,8	0	2,5	0	1,8	0	0,2	0
Wild M. J. Jones	3,2	0	1,7	0,8	1,6	0	3,3	0	0,8	0
Cleviewilt-6	4,8	4,5	3,2	2,2	5,0	3,5	5,0	4,8	3,5	2,5
LA-887	5,0	5,0	3,3	1,5	2,5	2,5	4,8	4,8	2,8	2,5
M-315 RNR	1,3	0	0,5	0	0,8	0	1,2	0	0,8	0
Fibermax966	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

<sup>1</sup>Acessos de algodoeiro descritos na tabela 2;

<sup>2</sup>Populações de *M. incognita* descritas na tabela 1.

<sup>3</sup>Média dos valores (8 repetições) de IG ou IMO; 0: sem galhas ou massas de ovos, 1: 1-2 galhas ou massas de ovos, 2: 3-10 galhas ou massas de ovos, 3: 11-30 galhas ou massas de ovos, 4: 31-100 galhas ou massas de ovos, e 5: >100 galhas ou massas de ovos (Hartman & Sasser, 1985).

#### 4. DISCUSSÃO

Apesar da existência de duas raças (raças 3 e 4) e dois perfis de esterase (I1 e I2), uma baixa variabilidade genética foi observada entre as populações brasileiras de *M. incognita* em algodoeiro. Resultados semelhantes foram relatados para outras espécies de *Meloidogyne* (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Randig *et al.*, 2002;

Carneiro *et al.*, 2004; Cofcewicz *et al* 2005; Santos *et al* 2012; Correa *et al.*, 2013), e pode estar relacionado com o modo de reprodução partenogenético mitótico dessas espécies (Triantaphyllou, 1985). A identificação das raças para os nematoides das galhas é importante não só para a caracterização de resistência, mas também nos programas de manejo em áreas infestadas (Fassuliotis, 1985; Ibrahim & Lewis, 1993; Castro *et al.*, 2003). No entanto, embora a determinação da raça seja importante na prática, Moens *et al.* (2009) recomendaram a suspensão desta terminologia, já que este conceito nunca foi universalmente aceito porque mede uma parcela muito restrita da variação do potencial de variabilidade parasitária. Neste estudo, não foi observado relação entre raça, fenótipos enzimáticos (I1 e I2) e polimorfismo genético. Esses resultados sugerem que, para *M. incognita*, raças não têm um determinismo genético, o que está de acordo com observações anteriores (Carneiro & Cofcewicz, 2008). De fato, apesar dos esforços contínuos de vários grupos de pesquisa, nenhuma correlação foi encontrada entre dados isoenzimáticos/moleculares (polimorfismo infraespecífico) para diferentes espécies de *Meloidogyne* (Cenis, 1993; Baum *et al.*, 1994). Além disso, não observamos nenhuma correlação entre raça, fenótipo enzimático, diversidade genética e agressividade/virulência. Os resultados obtidos neste trabalho podem indicar uma possível relação geográfica e genética entre as populações de *M. incognita* de algodão. Resultados similares foram observados para *M. arenaria* em diferentes culturas (Carneiro *et al.*, 2008). No entanto, seria necessário confirmar esta tendência pela análise de um maior conjunto de populações desses nematoides do algodão vindo de outros continentes.

A variação fisiológica entre espécies ou populações de nematoide das galhas pode ser expressa na interação planta-nematoide em três níveis: hospedabilidade ou não,

agressividade e virulência. Agressividade reflecte a capacidade de reprodução, tal como medida pelo FR, de nematoides em um hospedeiro susceptível, enquanto que a virulência é a capacidade de se reproduzir em uma planta com genes de resistência (Hussey & Janssen, 2002).

Neste estudo, considerando a cultivar FM966 como o controle susceptível, a população de PR-R3 (UMU) foi a mais agressiva, seguida pela MT-R4. As populações MT-R4 e PR-R3 (UMU) quebraram a resistência de Clewilt-6 e LA-887, dois acessos que são geralmente considerados como moderadamente resistentes a *M. incognita* (McClure *et al.*, 1974; Robinson *et al.*, 1997). A população MT-R4 (raça 4) foi mais agressiva do que a população PR-R3 (UMU) (raça 3), considerando os fatores de reprodução mais elevados observados nas cultivares moderadamente resistentes (Clewilt-6 e LA-887).

Nenhuma das cinco populações de *M. incognita* coletadas em diferentes áreas produtoras de algodão foram capazes de causar elevadas formações de galhas e massas de ovos, nem mesmo de apresentarem elevadas taxas de reprodução sobre os acessos resistentes de algodão TX-25, M-315 RNR, CIR1348, CIR1343 e Wild Mexican Jack Jones. Esses dados sugerem que a resistência desses acessos de algodão terá ampla aplicabilidade e será eficaz nas principais regiões produtoras de algodão do Brasil.

A resistência baseada em poucos genes pode impor uma pressão de seleção sobre as populações de nematoides e acelerar o surgimento de isolados virulentos (Janssen *et al.*, 1990), tal como foi observado em tomate com o gene de resistência *Mi* (Riggs & Winstead, 1959), na batata selvagem com o gene RMC2 (Janssen *et al.*, 1998) ou no café com o gene Mex-1 (Muniz *et al.*, 2009). O elevado nível de resistência a *M. incognita* encontrado na linhagem de algodão M-315 e em outras

linhagens derivadas da mesma fonte Auburn 634 não tem sido transferido para variedades superiores. Essa resistência é herdada de dois genes importantes, um, possivelmente, de Clewilt-6 e o outro de Wild México Jack Jones (McPherson *et al.*, 2004; Starr *et al.*, 2010.). Clewilt-6 possui um gene de resistência recessivo que confere resistência moderada a *M. incognita* (Kirkpatrick & Rothrock, 2001), e acredita-se também ser a fonte de resistência em LA-887 (Jones *et al.*, 1990). Esse mesmo alelo de resistência está presente em algumas das variedades cultivadas no Brasil, apontando para a necessidade de combinações de genes de resistência mais eficientes. Todas as populações testadas foram avirulentas a M-315, que possui um gene adicional àquele proveniente de Clewilt-6. A resistência presente em Wild Mexican Jack Jones nunca foi transferida para as variedades cultivadas no Brasil. Esse acesso apresentou, curiosamente, um elevado nível de resistência a todas as populações testadas, mesmo para as mais virulentas. Os outros acessos que demonstraram altos níveis de resistência a todas as populações testadas (TX-25, CIR1348 e CIR1343) também constituem fontes interessantes de resistência e que, ao que se conhece até hoje, nunca foram utilizadas no melhoramento de variedades cultivadas. Estudos estão em curso a fim de determinar se esses alelos resistentes são diferentes de outros já descritos até hoje. A identificação e caracterização completa de novas fontes de resistência que podem ser utilizados em piramidação e/ou em rotações é uma meta importante para o controle eficaz e duradouro do nematoide das galhas do algodoeiro.

## 5. Literatura citada

- Abawi, G.S. & Chen, J. 1998. Concomitant pathogen and pest interactions. In K.R. Barker, G.A. Pederson, & G.L. Windham (Eds.), Plant and nematode interactions (pp. 135–58). Wisconsin: American Society of Agronomy.
- Anwar, S.A. & McKenry, M.V. 2007. Variability in reproduction of *Meloidogyne incognita* on six cultivars of cotton. *Journal of Nematology*, 39, 105-110.
- Baum, T.J.; Gresshoff, P.M.; Lewis, S.A. & Dean, R.A. 1994. Characterization and phylogenetic analysis of 4 root-knot nematode species using DNA amplification fingerprinting and automated polyacrylamide-gel electrophoresis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7, 39-47.
- Blok, V.C.; Phillips, M.S.; Mcnicol, J.W. & Fargette, M. 1997. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs. *Fundamental and Applied Nematology*, 20, 127-133.
- Boneti, J.I.S. & Ferraz, S. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne incognita* de raízes de cafeeiros. *Fitopatologia Brasileira*, 6, 553.
- Carneiro, R.M.D.G. & Almeida, M.R.A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécie. *Nematologia Brasileira*, 25, 35-44.
- Carneiro, R.M.D.G.; Tigano, M.S.; Randig, O.; Almeida, M.R.A. & Sarah, J.L. 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology*, 6, 287-298.
- Carneiro, R.M.D.G. & Cofcewicz, E. T. 2008. The taxonomy of *Meloidogyne* spp. from coffee. In R.M. Souza (Ed.), Plant parasitic nematodes of coffee (pp. 87-122). New York: APS Press & Springer.

- Carneiro, R.M.D.G.; dos Santos, M.F.A.; Almeida, M.R.A.; Mota, F.C.; Gomes, A.C.M.M. & Tigano, M.S. 2008. Diversity of *Meloidogyne arenaria* using morphological, cytological and molecular approaches. *Nematology*, 10, 819-834.
- Castagnone-Sereno, P. 2002. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes. *Euphytica*, 124, 193–199.
- Castagnone-Sereno, P.; Bongiovanni, M. & Wajnberg, E. 2007. Selection and parasite evolution: a reproductive fitness cost associated with virulence in the parthenogenetic nematode *Meloidogyne incognita*. *Evolutionary Ecology*, 21, 259–270.
- Castagnone-Sereno, P.; Piotte, C.; Abad, P.; Bongiovanni, M. & Dalmasso, A. 1991. Isolation of a repeated DNA probe showing polymorphism among populations. *Journal of Nematology*, 23, 316-320.
- Castagnone-Sereno P.; Piotte, C.; Uijthof, J.; Abad, P.; Wajnberg, E.; Wanlerberghe-Massutti, F.; et al. 1993. Phylogenetics relationships between amphimictic and partenogenetic nematodes of the genus *Meloidogyne* as inferred from repetitive DNA analysis. *Heredity*, 70, 195-204.
- Castagnone-Sereno, P.; Wanlerberghe-Massutti, F. & Leroy, F. 1994. Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. *Genome*, 37, 904-909.
- Castro, J.M.C.; Lima, R.D.D. & Carneiro, R.M.D.G. 2003. Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de regiões brasileiras produtoras de soja. *Nematologia Brasileira*, 27, 1-12.
- Cenis, J.L. 1993. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology*, 83, 76-80.
- Cofcewicz, E. T.; Carneiro, R. M. D. G.; Randig, O.; Chabrier, C. & Quénéhervé, P. 2005. Diversity of *Meloidogyne* spp. on *Musa* in Martinique, Guadeloupe and French Guiana. *Journal of Nematology*, 37, 313-322.

Correa, V. R., Mattos, V. S., Almeida, M. R. A., Santos, M. F. A., Tigano, M. S., Castagnone-Sereno, P. and Carneiro, R. M. D. G. (2013b), Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* and development of a species-specific SCAR marker for its diagnosis. *Plant Pathology*. doi: 10.1111/ppa.12108.

Davis, R.F. & Kemerait, R.C. 2009. The multi-year effects of repeatedly growing cotton with moderate resistance to *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 41, 140-145.

Elliott, C.L.; Lewis, S.A. & Mueller, J.D. 1998. Galling of South Carolina *Meloidogyne incognita* populations on resistant cotton genotypes. In *Proceedings of the 1998 Beltwide Cotton Conference* (p.145). Memphis: National Cotton Council of America.

Fargette, M.; Lollier, V.; Phillips, M.; Blok, V. & Frutos, R. 2005. AFLP analysis of the genetic diversity of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, major agricultural pests. *Comptes Rendus Biologies*, 328, 455–462.

Fassuliotis, G. 1985. The role of the nematologists in the development of resistant cultivars. In J.N. Sasser, & C.C. Carter (Eds.), *An advanced treatise on Meloidogyne*, vol.1 (pp. 233–240). Raleigh: North Carolina State University Graphics.

Hartman, K.M. & Sasser, J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In C.C. Carter, & J.N. Sasser (Eds.), *An advanced treatise on Meloidogyne*, vol. 2, (pp. 69-77). Raleigh: North Carolina State University Graphics.

Hussey, R.S. & Janssen, G.J.W. 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In J.L. Starr, R. Cook, & J. Bridge (Eds.), *Plant resistance to parasitic nematodes* (pp. 43-70). Wallingford: CABI International.

Ibrahim, I.K.A. & Lewis, S. A. 1993. Pathogenicity and reproduction of *Meloidogyne arenaria* race 1 and 2 and *M. incognita* race 3 on soybean. *Journal of Nematology*, 23, 159-166.

- Janssen, R., Barker, J. & Gommers, F.J. 1990. Selection of virulent and avirulent lines of *Globodera rostochiensis* for the H1 resistance gene in *Solanum tuberosum* spp. andigena CPC 1673. *Revue de Nematologie*, *13*, 265.
- Janssen, G.J.W.; Scholten, O.E.; Van Norel, A. & Hoogendoorn, J. 1998. Selection of virulence in *Meloidogyne chitwoodi* to resistance in the wild potato *Solanum fendleri*. *European Journal of Plant Pathology*, *104*, 645-651.
- Jensen, J.L.; Bohonak, A.J. & Kelley, S.T. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics*, *6*, 13. v.3.23 <http://ibdws.sdsu.edu/>.
- Jeffers, D.P. & Roberts, P.A. 1993. Effect of planting date and host genotype on the root-knot nematode-*Fusarium* wilt disease complex of cotton. *Phytopathology*, *83*, 645–654.
- Jones, J.E.; Dickson, J.L.; Aguillar, W.; Caldwell, W.D.; More, S.H.; Hutchinson, R.I., et al. 1990. Stoneville LA 887: A new cotton variety. *Louisiana Agriculture*, *33*, 5.
- Kirkpatrick, T.L. & Rothrock, C.S. 2001. Compendium of cotton diseases. Minnesota: APS press.
- McClure, M.A.; Ellis, K.C. & Nigh, E.L. 1974. Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne incognita* in resistant cotton. *Journal of Nematology*, *1*, 21-26.
- McPherson, M.G.; Jenkins, J.N.; Watson, C.E. & McCarty Jr. 2004. Inheritance of root-knot nematode resistance in M-315 RNR and M-78 RNR cotton. *Journal of Cotton Science*, *8*, 154-161.
- Moens, M.; Perry, R.N. & Starr, J.L. 2009. *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In R.N. Perry, M. Moens, & J.L. Starr (Eds.), *Root-knot nematodes* (pp.1-17). Wallingford: CABI International.
- Mota, F.C.; Alves, G.C.S.; Giband, M.; Gomes, A.C.M.M.; Sousa, F.R.; Mattos, V.S.; et al. (2012). New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton

accessions and histological characterization of the defense mechanisms. *Plant Pathology*, doi: 10.1111/ppa.12022.

Muniz, M.F.S.; Campos, V.P.; Castagnone-Sereno, P.; Castro, J.M.C.; Almeida, M.R.A. & Carneiro, R.M.D.G. 2008. Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. *Nematology*, 10, 897-910.

Muniz, M.F.S.; Campos, V.P.; Moita, A.W.; Gonçalves, W.; Almeida, M.R.A.; Sousa, F.R.; et al. 2009. Reaction of coffee genotypes to different populations of *Meloidogyne* spp.: detection of a naturally virulent *M. exigua* population. *Tropical Plant Pathology*, 34, 370-378.

Netscher, C. 1977. Observation and preliminary studies on the occurrence of resistance-breaking biotypes of *Meloidogyne* spp. on tomato. *Cahier ORSTOM Series Biologie*, 11, 173-178.

Ogallo, J.L.; Goodell, P.B.; Eckert, J. & Roberts, P.A. 1997. Evaluation of NemX, a new cultivar of cotton with high resistance to *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 29, 531-537.

Oostenbrink, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen*, 66 4.

Randig, O., Bongiovanni, M., Carneiro, R.M.D.G. & Castagnone-Sereno, P. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome*, 45, 862-870.

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

Roberts, P.A. 1992. Current status of the availability, development, and use of host plant resistance to nematodes. *Journal of Nematology*, 24, 213-227.

Roberts, P.A. & I.J. Thomason. 1989. A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. In G.E. Russell

(Ed.), Genetical and biochemical aspects of invertebrate crop pests (pp. 269-296). Hampshire: Intercept Andover.

Roberts, P.A. 1995. Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 33, 199–221.

Roberts, P.A.; Frate, C.A.; Mathews, W.C. & Osterli, P.P. 1995. Interaction of virulent *Meloidogyne incognita* and *Fusarium* wilt on resistant cowpea genotypes. *Phytopathology*, 85, 1288-1295.

Robinson, M.R.; Jenkins, J.N. & McCarty Jr, J.C. 1997. Different sources of root-knot nematode resistance. In *Proceeding of Beltwide Cotton Reseach Conferences*. Memphis: National Cotton Council.

Robinson, A.F.; Bowman, D.T.; Cook, C.G.; Jenkins, J.N.; Jones, J.E.; May, L.O.; et al. 2001. Nematode resistance. In T.L. Kirkpatrick, & C.S. Rothrock (Eds.), *Compendium of cotton diseases* (pp. 68-72). Saint Paul, MN: APS Press.

Santos, M.F.A.; Furlanetto, C.; Almeida, M.R.A.; Carneiro, M.D.G.; Mota, F. C.; Mendes, A.C.M.; et al. 2012. Biometrical, biological, biochemical and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species. *European Journal of Plant Pathology*, 134, 671-684.

Semlat, J.P.; Wajnberg, E.; Dalmasso, A.; Abad, P. & Castagnone-Sereno P. 1998. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. *Molecular Ecology*, 7, 119–125.

Starr, J.L.; Carneiro, R.G. & Ruano, O. 2005. Nematodes parasites of cotton and other tropical fiber crops. In M. Luc, R.A. Sikora, & Bridge, J. (Eds.), *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (pp. 733-750). Wallingford: CABI International.

Starr, J.L. & Mercer, C.F. 2009. Development of resistant varieties. In R.N. Perry, M. Moens, & J.L. Starr (Eds.), *Root-knot nematodes* (pp. 326-337). Wallingford: CABI International.

Starr, J.L.; Moresco, E.R.; Smith, C.W.; Nichols, R.L.; Roberts, P.A. & Chee P. 2010. Inheritance of resistance to *Meloidogyne incognita* in primitive cotton accessions from Mexico. *Journal of Nematology*, 42, 352–358.

Suazo, A. & Hall, H.G. 1999. Modification of the AFLP protocol applied to honey bee (*Apis mellifera* L.) DNA BioTechniques, 26, 704–709.

Swofford, D.L. 2002. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Triantaphyllou, A.C. 1985. Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. In C.C. Carter, & , J.N. Sasser (Eds.), An advanced treatise on *Meloidogyne*, vol. 1, biology and control (pp. 113-126). Raleigh: North Carolina State University Graphics.

Veech, J.A. & Starr, J.L. 1986. Comparison of development reproduction and aggressiveness of *Meloidogyne incognita* race 3 and 4 on cotton. *Journal of Nematology*, 18, 413-415.

Zhou, E. ; Wheeler, T.A. & Starr, J.L. 2000. Root galling and reproduction of *Meloidogyne incognita* isolates from Texas on resistant cotton genotypes. *Journal of Nematology*, 32, 513-518.

# CAPÍTULO 3

---

---

**IDENTIFICAÇÃO DE QTLs LIGADOS À RESISTÊNCIA A  
*Meloidogyne incognita* RAÇA 3 EM UM CRUZAMENTO DE  
*Gossypium hirsutum* X *Gossypium barbadense*.**

## **Identificação de QTLs ligados à resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3 em um cruzamento de *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense*.**

### **RESUMO**

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) é uma cultura importante, amplamente cultivada nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É bastante suscetível a diversos estresses bióticos e abióticos, para os quais muitas das espécies silvestres são resistentes. O uso de plantas resistentes é o método mais econômico, prático e ambientalmente correto de fornecer proteção, principalmente às pragas e doenças, que causam grandes prejuízos. Visando à introgressão de genes de resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3 no algodão cultivado, um mapa de ligação foi construído, usando uma população F<sub>2</sub>, obtida do cruzamento entre o genótipo *G. hirsutum* FM 966 (suscetível) e o acesso *G. barbadense* CIR1348 (resistente). Esse mapa foi baseado em marcadores microssatélites. No total, 269 marcadores microssatélites já publicados foram usados. Os 269 pares de primers SSR revelaram 313 locos que segregaram na população de mapeamento. Como em outros mapas genéticos de algodão tetraploide publicados, alguns marcadores amplificaram mais de um loco. O mapa genético construído com a população F<sub>2</sub> consistiu de 29 grupos de ligação. Um comprimento total de 4.294 cM foi obtido e os grupos variaram de 52,8 cM (com 3 marcadores) a 241,3 cM (14 marcadores) com uma distância média de 15 cM entre marcadores adjacentes. Esse mapa foi utilizado para identificação de QTLs ligados à resistência a *M. incognita* raça 3. Dois QTLs foram identificados pelo método de mapeamento por intervalo composto. Sendo um QTL localizado no cromossomo 11 e outro, no 15. Marcadores associados a estes QTLs, também foram identificados. No cromossomo 11, foram encontrados os marcadores CIR069a e CIR316b. Já no cromossomo 15, foram encontrados os

marcadores JESPR152 e NAU3254. Por meio desses marcadores será realizada a seleção assistida em um programa de melhoramento da Embrapa algodão, objetivando-se a introgressão dos genes de resistência do acesso CIR 1348 ao *M. incognita* em uma determinada cultivar de algodão.

Palavras-chave: algodão, marcador microssatélite, nematoide das galhas, seleção assistida.

**Identification of QTLs associated with resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in a crossing *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense*.**

**ABSTRACT**

Cotton (*Gossypium hirsutum*) is an important crop widely grown in tropical and subtropical regions worldwide. Cultivated cottons are mostly susceptible to several biotic and abiotic agents, while some of their wild relatives are resistant. The use of resistant plants is the most economical, practical and environmentally safe means for managing pests and diseases that cause great losses to cotton crop. The objectives of this study were to introgress gene(s) for resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 from *G. barbadense* access CIR1348 (resistant) into cultivated *G. hirsutum* variety FM 966 (susceptible) using a F<sub>2</sub> population from crosses between the two genotypes and to build a genetic linkage map. This map was based on a set of co-dominant microsatellite markers present in the two species. A total of 232 microsatellites markers published elsewhere were used. The 232 pairs of SSR primers revealed 284 loci that segregated within the mapping population. Similar to published genetic maps of tetraploid cotton genotypes, some markers amplified more than a locus. The genetic map constructed with the F<sub>2</sub> population consisted of 29 linkage groups. A total length of 4,294 cM was obtained and groups varied from 52.8 cM (with 3 markers) to 241.3 cM (14 markers) with an average distance of 15.11 cM between adjacent markers. This map was used for the identification of quantitative trait loci (QTLs) possibly associated with resistance to resistance to *M. incognita* race 3. Two QTLs were identified by composite interval mapping method with values of minimum LOD established by the software WinQTL Cartographer. One QTL is found in Group 11 and another in group 15. Markers associated with these QTLs were also identified. Markers CIR069a and CIR316b were found on chromosome 11, while markers JESPR152 and NAU3254 were found on chromosome 15.

Keywords: cotton microsatellite marker, root-knot nematode, assisted selection.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, não apenas no Brasil, mas também no mundo, o melhoramento genético do algodoeiro visando à resistência ao nematoide das galhas, *Meloidogyne incognita*, depende de um número restrito de fontes (genes) de resistência (Robinson *et al.*, 2001; McPherson *et al.*, 2004; Starr *et al.*, 2010). A variabilidade na virulência de isolados de *M. incognita* em genótipos de algodão resistentes tem sido relatada (Elliott *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2000; Anwar & McKenry, 2007). Isso se deve ao cultivo intensivo, nos últimos anos, de cultivares de algodoeiro que possuem as mesmas fontes de resistência.

Resistência a *M. incognita* tem sido descoberta em germoplasma cultivado e silvestre (Miles, 1939; Smith, 1954; Wiles, 1957; Jones *et al.*, 1958; Turcotte *et al.*, 1963; Shepherd 1974a, b, 1982, 1983; Shepherd *et al.*, 1988; Cook *et al.*, 1997; Robinson & Percival 1997; Robinson *et al.*, 1999, 2004; Mota *et al.*, 2012). E, atualmente, algumas cultivares estão disponíveis para os produtores. Como exemplo podem-se citar as seguintes: Stoneville LA887 (Jones *et al.*, 1991), Acala Nem-X (Oakley 1995a, b); Stoneville 5599 BR (McCall, 2003), e DP174 RF (Santos *et al.*, 2009).

O uso de plantas resistentes é o método mais econômico, prático e ambientalmente correto de fornecer proteção ao algodão contra *M. incognita*. Três importantes fontes de resistência ao nematoide das galhas são reconhecidas em algodoeiro (Robinson *et al.*, 2001). A primeira e mais importante é Auburn 623 RNR, que se originou a partir de segregação transgressiva em um cruzamento entre dois pais moderadamente resistentes, Clewewilt 6 e México Wild Jack Jones (Shepherd 1974a, b). Clewewilt 6 também foi utilizada para desenvolver a linhagem LA434-RKR, resistente

ao nematoide das galhas, que representa a segunda fonte de resistência. A terceira fonte é uma resistência encontrada em uma cultivar comercial, Acala NemX (Ogallo et al., 1997), cuja fonte de resistência é o acesso N6072 (Oakley, 1995).

Devido à impossibilidade prática de realizar inoculações artificiais nos genótipos gerados a cada ano pelos programas de melhoramento de algodoeiro, quase toda a avaliação da resistência ao nematoide das galhas é realizada em campos infestados. De modo geral, a quantidade de inóculo naturalmente presente em campo não é homogênea, o que dificulta a seleção de genótipos resistentes. Portanto, a confiabilidade do processo de seleção é pequena, ocorrendo possibilidades de eliminar plantas com níveis adequados de resistência e manter outras suscetíveis até estágios avançados do programa.

Marcadores moleculares são uma ferramenta muito utilizada para diversas análises genéticas. Por meio deles pode-se realizar a construção de mapas de ligação e auxiliar a introgressão de genes em programas de melhoramento genético. O principal objetivo dos trabalhos que buscam associar marcadores a um dado caráter é permitir a seleção indireta de indivíduos por meio do uso de marcadores. Este processo é conhecido como seleção assistida por marcadores. Em situações nas quais há dificuldade de seleção por meio de fenotipagem, como é o caso da seleção para a resistência ao nematoide das galhas, a identificação de marcadores moleculares ligados a um ou mais genes de resistência é de grande utilidade.

Marcadores microssatélites têm sido utilizados em diversas espécies de plantas para a construção de mapas genéticos, para o mapeamento de QTLs e para uso em seleção assistida, pois são codominantes, o que possibilita a discriminação de genótipos heterozigotos, e possuem caráter multi-alélico (Guimarães, 2006). Ynturi e colaboradores (2006) identificaram marcadores microssatélites associados a genes que

conferem resistência a *M. incognita*, para serem usados em seleção assistida. Os autores desse trabalho sugeriram que a resistência ao nematoide era proveniente de pelo menos dois genes localizados nos cromossomos 11 e 14, e que os marcadores BNL 3661, 3544 e 3645 estão próximos ao gene localizado no cromossomo 14; e o marcador BNL 1231 próximo ao gene do cromossomo 11.

No Brasil há poucas variedades comerciais de algodão com nível de resistência adequado ao nematoide das galhas. Sendo assim, é importante e necessária a identificação e caracterização de novas fontes de resistência e sua incorporação em germoplasma melhorado. Recentemente, Mota e colaboradores (2012) realizaram análises de novas fontes de resistência do algodoeiro a *M. incognita* raça 3. Acessos de *Gossypium* ssp., alguns deles selvagens, nunca testados no Brasil, foram avaliados quanto à resistência a *M. incognita* em experimentos em casa de vegetação. Na análise citada, vários acessos foram considerados resistentes, dentre eles o acesso CIR1348, o qual é objeto de estudo deste trabalho. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi identificar marcadores associados à QTLs de resistência ao nematoide das galhas das galhas *M. incognita* raça 3. Para isso, foi construído um mapa genético de ligação para o algodão baseado em marcadores microssatélites já publicados e, com base nesse mapa foram identificados QTLs ligados à resistência a esse nematoide.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2 Material vegetal**

A população F<sub>2</sub> foi construída por autopolinização de uma única planta F<sub>1</sub> proveniente do cruzamento do genótipo *G. hirsutum* FM 966 (progenitor feminino), suscetível a *M. incognita*, com o acesso resistente *G. barbadense* CIR1348 (progenitor

masculino). As sementes das plantas F<sub>2</sub> foram produzidas pelos colaboradores da Embrapa Algodão. O cruzamento para obter as sementes F<sub>2</sub> foi realizado no Núcleo de Pesquisa do Cerrado, situado em Santo Antônio de Goiás (GO), sob coordenação do pesquisador Dr. Paulo Barroso. O cruzamento foi realizado em casa de vegetação, em condições de temperatura e umidade controladas. Um total de 240 sementes F<sub>2</sub> foi enviado para a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), local onde o experimento de fenotipagem foi realizado.

## **2.2. Extração de DNA e PCR dos locos microssatélites**

Tecidos foliares jovens foram utilizados para a extração do DNA genômico total, utilizando o kit de extração NucleoSpin® (MACHEREY-NAGEL). A concentração de DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, comparando-se as intensidades de fluorescência de cada amostra corada com brometo de etídio com diferentes padrões de DNA Lambda. O sucesso da extração também foi verificado por meio da amplificação por PCR usando dois pares de primers microssatélites CIR 249 e BNL2496, de padrão de bandas conhecido e contrastantes entre os dois parentais. Para esse teste, as reações de PCRs foram realizadas em volumes de 13 µl, contendo tampão de PCR 1X (Tris-HCl 10mM pH8,3, KCl 50mM), MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, 1 µg/µl de BSA purificado (New England Biolabs, MA, EUA), 5 mol de cada primer e 10 ng de DNA genômico. As amplificações foram realizadas em termocicladores ABI 9700 (Applied Biosystems, CA, EUA) ou PTC-200 (MJ Research, MA, EUA), com as seguintes condições: 94° C por 5 minutos (1 ciclo), 94° C por 1 min.; 48-64° C por 1 min.; 72° C por 1 min. (30 ciclos); e uma extensão final a 72° C por 7 minutos (1 ciclo).

As temperaturas de anelamento variaram para cada par de primers. Os produtos da PCR foram visualizados em géis de agarose (3,5%), contendo brometo de etídio. Os comprimentos dos fragmentos foram estimados nos géis, por comparações com padrões de bandas de tamanhos conhecidos (10-pb DNA ladder). Esta parte do trabalho foi realizada no Laboratório de Genética Vegetal do Cenargen, sob orientação dos pesquisadores Dr. Márcio Moretzsohn e Dra. Vânia Azevedo.

**Genotipagem dos marcadores SSR em sequenciador capilar:** A genotipagem das plantas F<sub>2</sub> e dos parentais foi realizada em cooperação com o CIRAD (Centro Internacional de Pesquisa Agrícola para o Desenvolvimento) da França. Para isso, as amostras de DNA de tecidos foliares extraídas no Brasil foram enviadas para Montpellier. A metodologia usada na genotipagem foi descrita por Schuelke (2000) e descrita resumidamente a seguir. Um dos primers específicos de cada par foi sintetizado com uma sequência M13 adicionada à extremidade (5'- CAC GAC GTT GTA AAA CGA C -3'), e na reação de PCR foi incluído um primer complementar à sequência M13 marcado com um fluorocromo (FAM, NED, VIC ou PET), além dos dois primers específicos.

As reações de PCR foram realizadas em placas de 384 poços, num volume final de 10 µl contendo 5 ng de DNA, tampão de PCR 1X, 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,08 µM do iniciador contendo a sequência específica M13, 0,1 µM do segundo iniciador específico, 0,1 µM do iniciador M13 de 19 nucleotídios marcados com fluorocromo, e 1 U de *Taq* DNA polimerase .

O perfil de amplificação utilizado foi o seguinte: 5 min. a 94 ° C; 35 ciclos: 30 seg a 94 ° C, 1 min. a 55 ° C, 1 min. a 72 ° C, 30 min. a 72 ° C.

Para os testes preliminares de seleção de marcadores, foram usados apenas os genótipos (DNAs) parentais. Para a genotipagem da população F<sub>2</sub>, foram formados grupos ou “pools” de 8 ampliações, de acordo com o tamanho de cada um dos fragmentos amplificados e o fluorocromo utilizado (dois marcadores por fluorocromo). Dois conjuntos (ou ‘pools’) de oito primers SSR foram testados na mesma placa 384, com os dois parentais e a população F<sub>2</sub> repetidos. Foram adicionados 10 µl do marcador GeneScan 600 a cada poço e a placa foi, em seguida, colocada em um sequenciador automático capilar ABI 3500XL.

### **2.3. Construção do mapa**

Um conjunto de 313 marcadores microssatélites publicados (Blenda *et al.*, 2012), foi selecionado conforme sua distribuição nos 26 cromossomos do algodão, tomando como referência um mapa genético consenso de alta densidade (high density consensus -HDC) publicado para o algodão (Blenda *et al.*, 2012). Esses marcadores foram testados primeiramente nos parentais FM966 e CIR1348, para identificação de primers polimórficos e apenas estes foram utilizados para a genotipagem da população F<sub>2</sub> constituída de 180 indivíduos. Alguns marcadores amplificaram mais de um loco e estes foram designados pela adição de uma letra minúscula em ordem alfabética após o nome do loco.

O teste de qui-quadrado ( $X^2$ ) foi utilizado para testar a hipótese nula de segregação 1:2:1 ou 3:1 de todos os marcadores. Apenas os marcadores que não apresentaram distorções da proporção 1:2:1 esperada, a um limite de significância de 5%, foram utilizados inicialmente para a construção do mapa. As análises de ligação foram feitas usando o programa Mapmaker, versão 2.0 (Lander *et al.*, 1987). Um LOD

escore mínimo de 5 e uma fração de recombinação máxima ( $\theta$ ) de 0,35 foram utilizados como parâmetros para estabelecimento dos grupos de ligação, usando a função “group”. A ordem mais provável dos marcadores em cada grupo de ligação foi estimada pelo método de máxima verossimilhança, usando a função “first order”. As ordens dos marcadores foram confirmadas por permutações de todas as trincas de marcadores adjacentes (função “ripple”). O comando “try” foi então usado para determinar a posição exata dos novos marcadores dentro de cada grupo. As novas ordens obtidas foram novamente confirmadas com o comando “ripple”. As frações de recombinação foram convertidas em distâncias de mapa, em centimorgans (cM), usando a função de mapeamento de Kosambi, que leva em consideração a interferência (I).

#### **2.4. Avaliação fenotípica**

Os progenitores, juntamente com três acessos de algodão usados como controle (Delta Opa, controle moderadamente resistente; M 315 controle resistente; LA 887 controle moderadamente resistente) e 180 indivíduos  $F_2$  foram avaliados para resistência/suscetibilidade ao nematoide *M. incognita* raça 3. Esse ensaio foi montado em blocos aumentados de Federer, sendo que em todos os blocos havia as seguintes plantas: 30 plantas  $F_2$ , uma repetição de cada progenitor e os três acessos controles, totalizando 35 plantas por bloco. Oito blocos foram montados em casa de vegetação (Figura 1a). Após a germinação, plântulas de 30 cm de altura foram inoculadas (Figuras 1b, 1c e 1d) com 10.000 ovos de *M. incognita* raça 3 proveniente de uma população pura mantida em tomateiro em casa de vegetação. Decorridos 4 meses da inoculação, as raízes foram avaliadas conforme metodologia descrita no capítulo 2.



**Figura 1** - Blocos montados em casa de vegetação; e inoculação das plantas de algodão com 10.000 ovos de *Meloidogyne incognita* raça 3.

## 2.5 Análise de QTLs

Para a análise dos QTLs ligados à resistência a *M. incognita* raça 3, utilizaram-se os dados de índice de galhas (IG) e índice de massas de ovos (IMO) e do fator de reprodução (FR), este foi transformado em  $\text{Log}(\text{FR}+1)$ , para se obter uma distribuição normal do FR. O método utilizado para detecção dos QTLs foi o mapeamento por intervalo composto. As análises foram realizadas com o programa WinQTL Cartographer, versão 2.5 (Wang *et al.*, 2006). Os pontos de corte foram determinados

pelo programa, via testes de permutação (Churchill & Doerge, 1994; Doerge & Churchill, 1996), sendo utilizadas 1000 permutações e um nível de significância de 0,05. Os testes de hipótese para presença do QTL foram realizados a cada 1 cM do mapa de ligação (“walk speed” = 1). As apresentações gráficas dos grupos de ligação e dos QTLs foram obtidas usando o programa MapChart, versão 2.1 (Voorrips, 2002).

### **3. RESULTADOS**

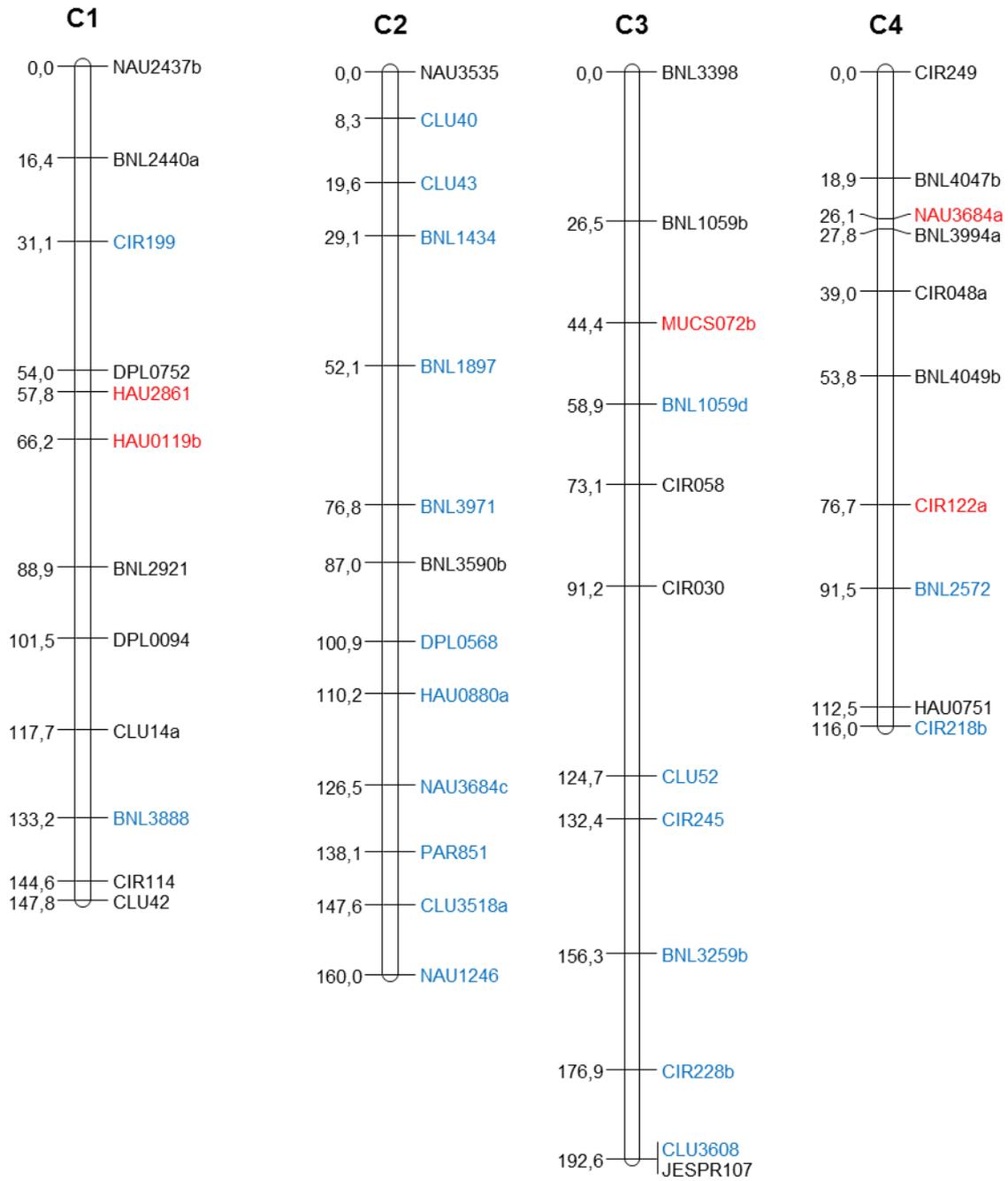
#### **Construção do mapa genético**

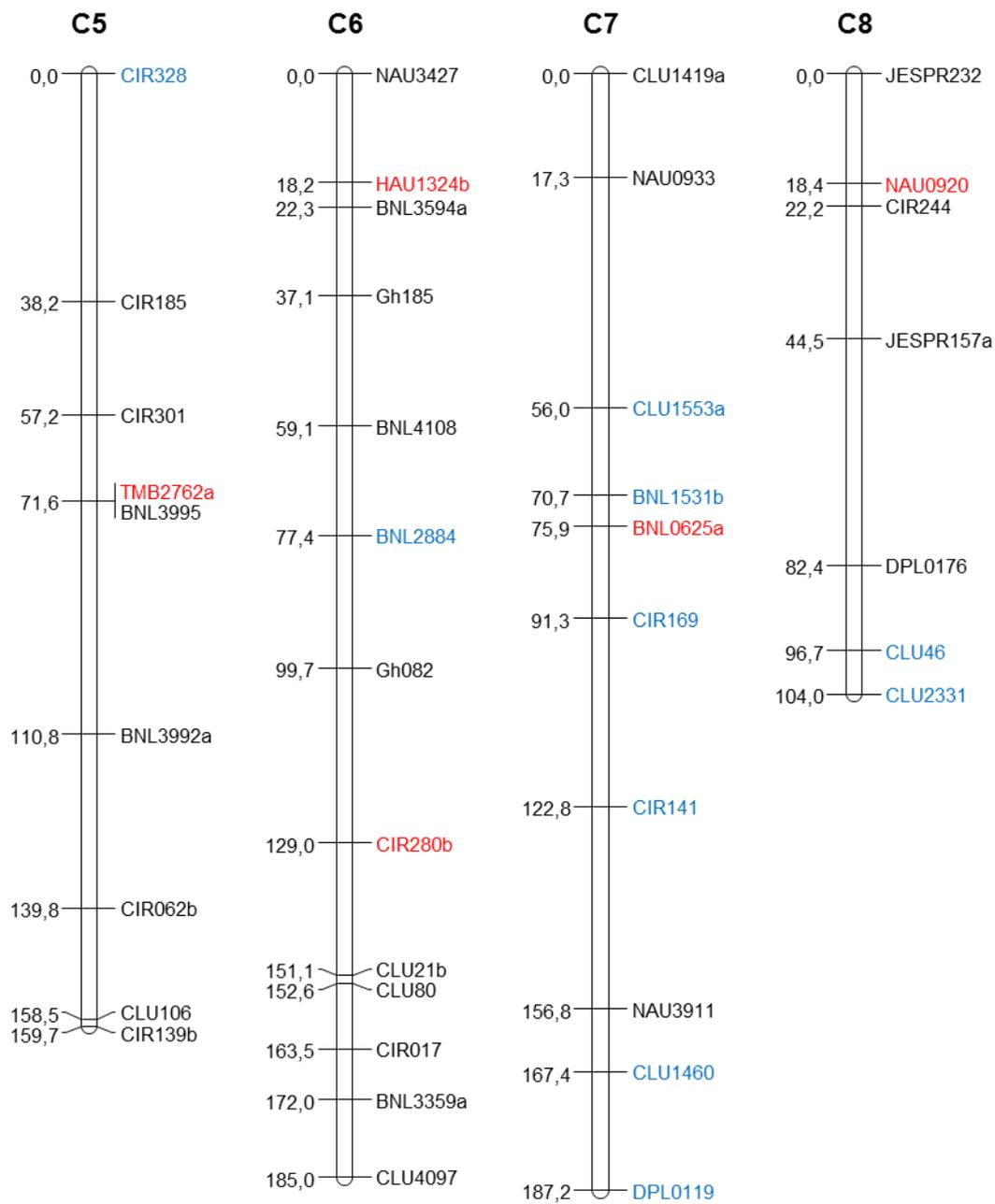
No total, 313 marcadores microssatélites foram selecionados de acordo com sua localização no genoma dos parentais. Desses marcadores, 269 mostraram-se polimórficos entre os pais e foram utilizados para genotipagem da população de mapeamento.

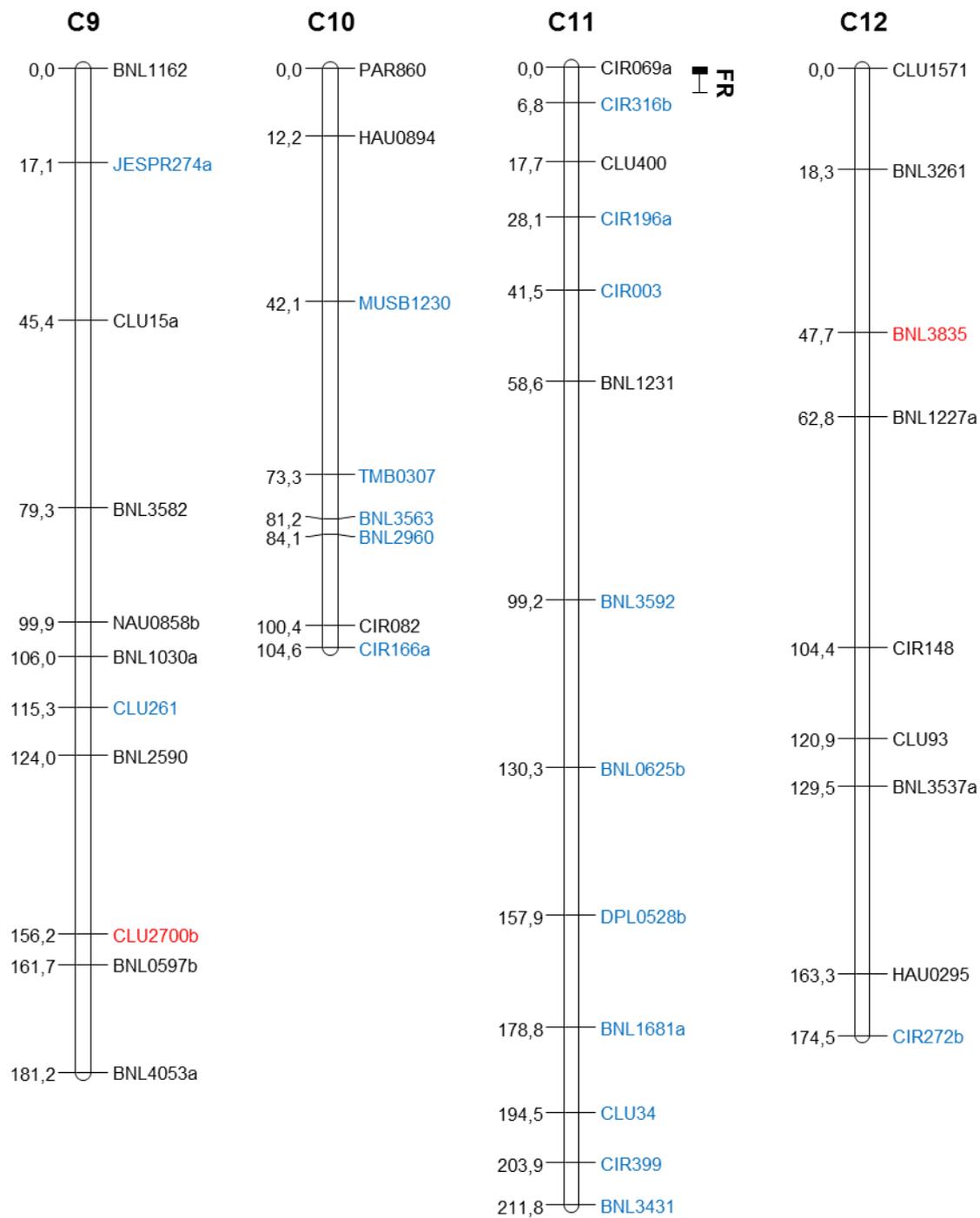
Os 269 pares de primers SSR amplificaram 313 locos. Como em outros mapas genéticos de algodão tetraploide publicados, alguns marcadores amplificaram mais de um loco. Duzentos e vinte e seis pares de primers amplificaram um loco, 42 revelaram dois locos, um par de primers amplificou 3 locos. Seis plantas foram excluídas das análises por apresentarem alelos não presentes em nenhum dos pais. Portanto, os dados de genotipagem de 174 plantas  $F_2$  foram utilizados para construção do mapa de ligação e mapeamento de QTLs.

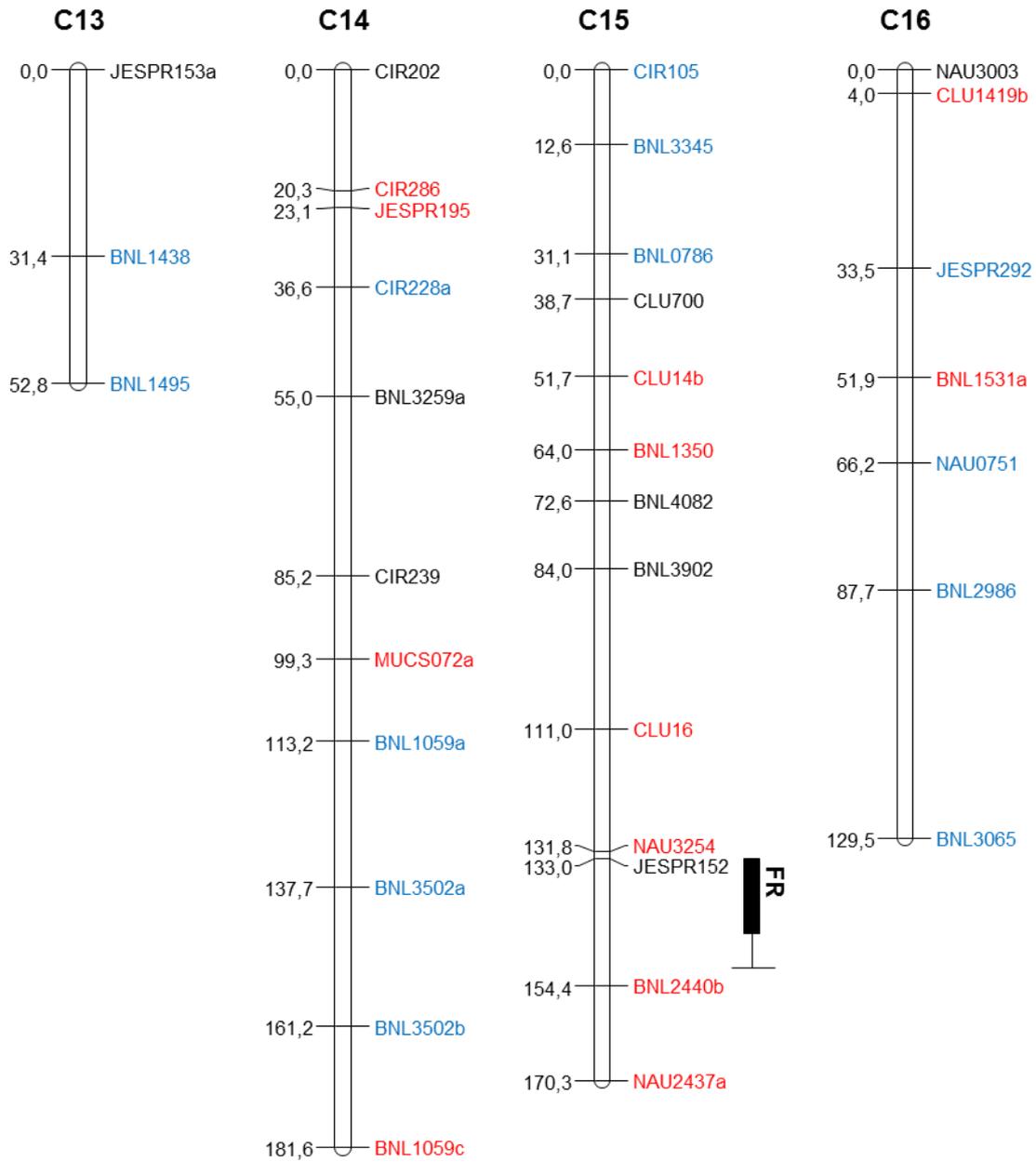
O mapa genético construído com a população  $F_2$  consistiu de 284 marcadores e 29 grupos de ligação (Figura 2). Um comprimento total de 4.294 cM foi obtido e os grupos variaram de 52,8 cM (com 3 marcadores) a 241,3 cM (14 marcadores), com uma distância média de 15,1 cM entre marcadores adjacentes (Tabela 1). A maioria dos intervalos entre marcadores adjacentes foi maior do que 10 cM.

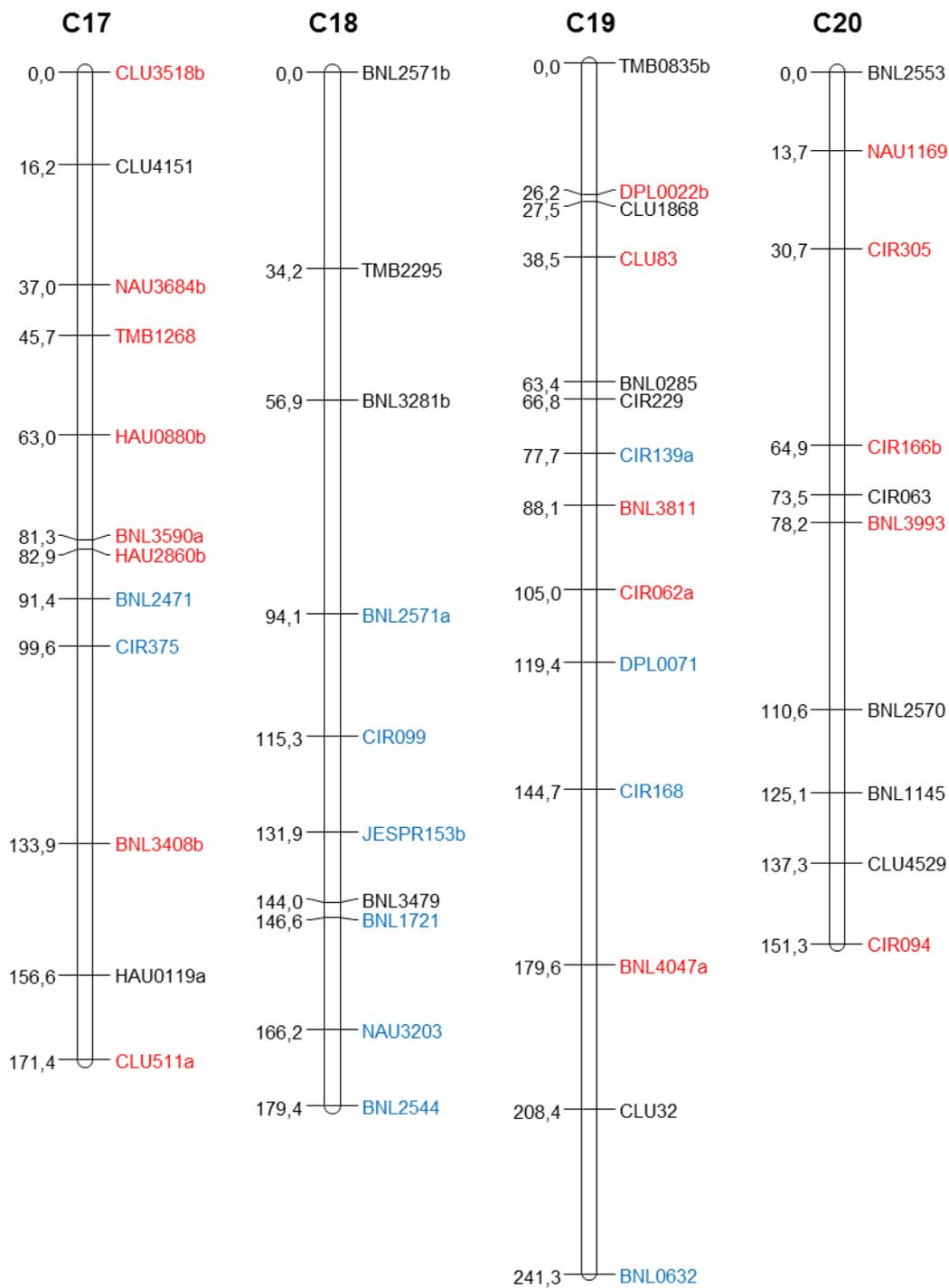
Os grupos de ligação formados foram classificados comparando-se os marcadores em comum com os 26 cromossomos do mapa HDC. Dessa forma, esses grupos foram atribuídos a cada um dos 26 cromossomos do algodão, sendo que os grupos C3B, C5B e C14B foram atribuídos aos cromossomos C3, C5 e C14, respectivamente, devido à presença de marcadores em comum com o mapa HDC.

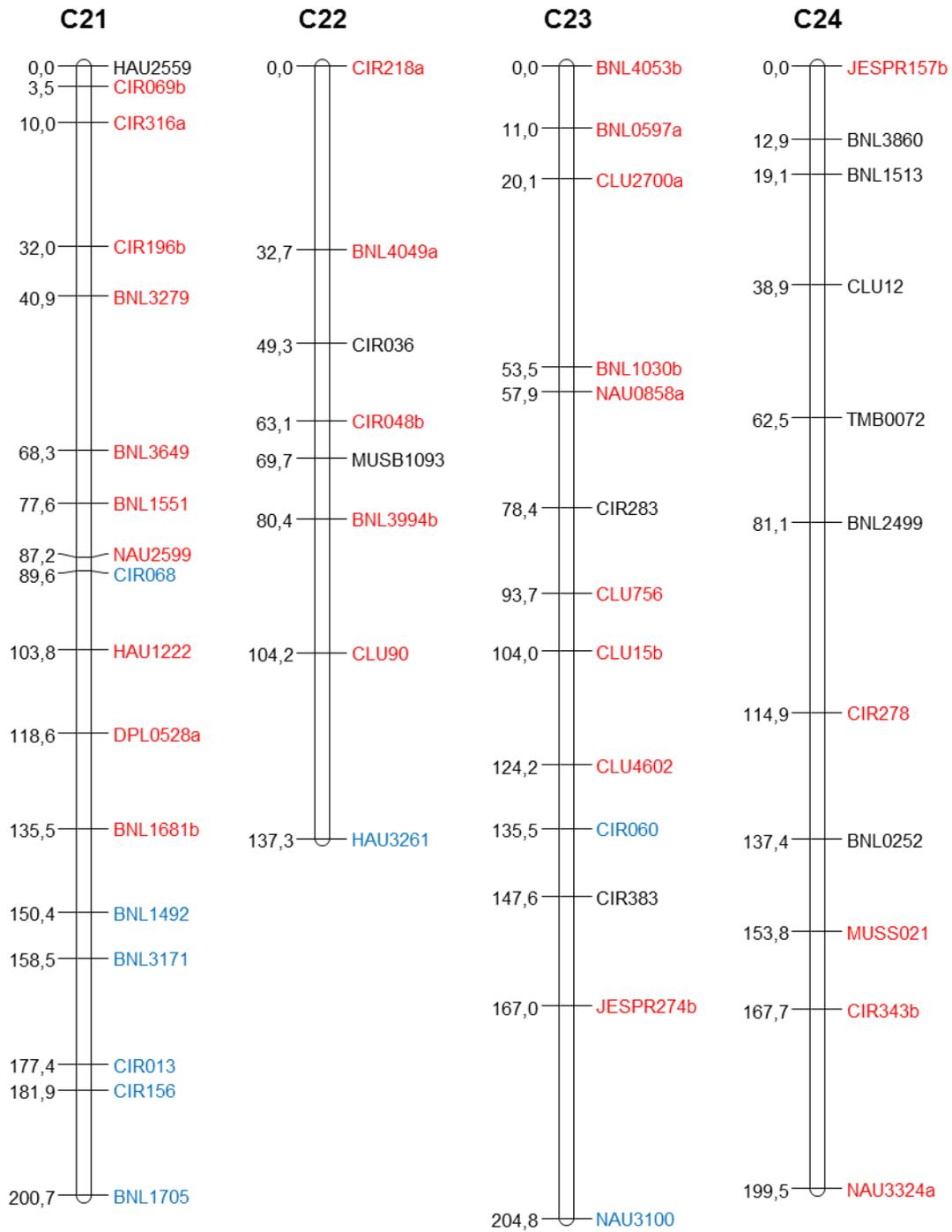


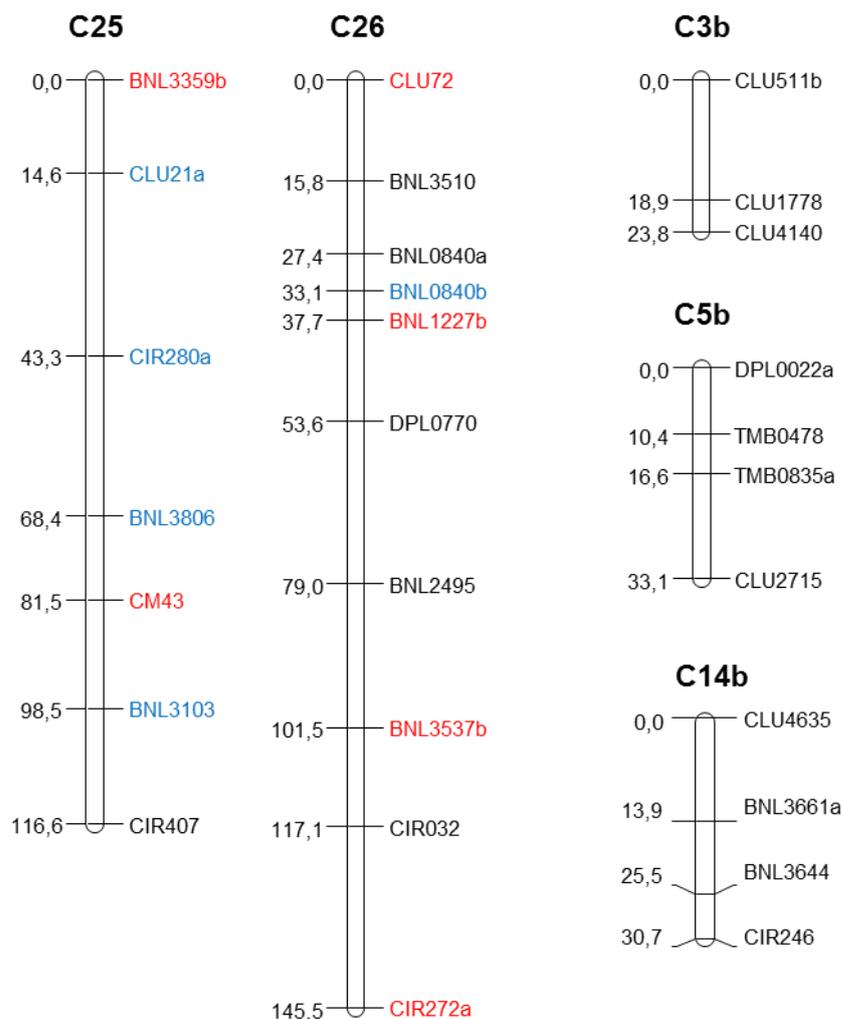












**Figura 2** - Mapa genético obtido pela análise de 174 plantas  $F_2$ , resultantes do cruzamento entre *Gossypium hirsutum* FM 966 e *G. barbadense* CIR 1348, com 29 grupos de ligação. Os nomes dos locos estão apresentados no lado direito de cada grupo de ligação e as suas posições, em cM (Kosambi, 1944) do lado esquerdo. Nomes na cor preta estão de acordo com a sequência do mapa HDC, marcadores de cor vermelha estão em grupos de ligação diferentes quando comparados com o HDC, já os nomes na cor azul estão no mesmo grupo do mapa HDC, porém em ordem diferente. QTLs ligados à resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3, identificados por mapeamento por intervalo composto são observados nos cromossomos 11 e 15.

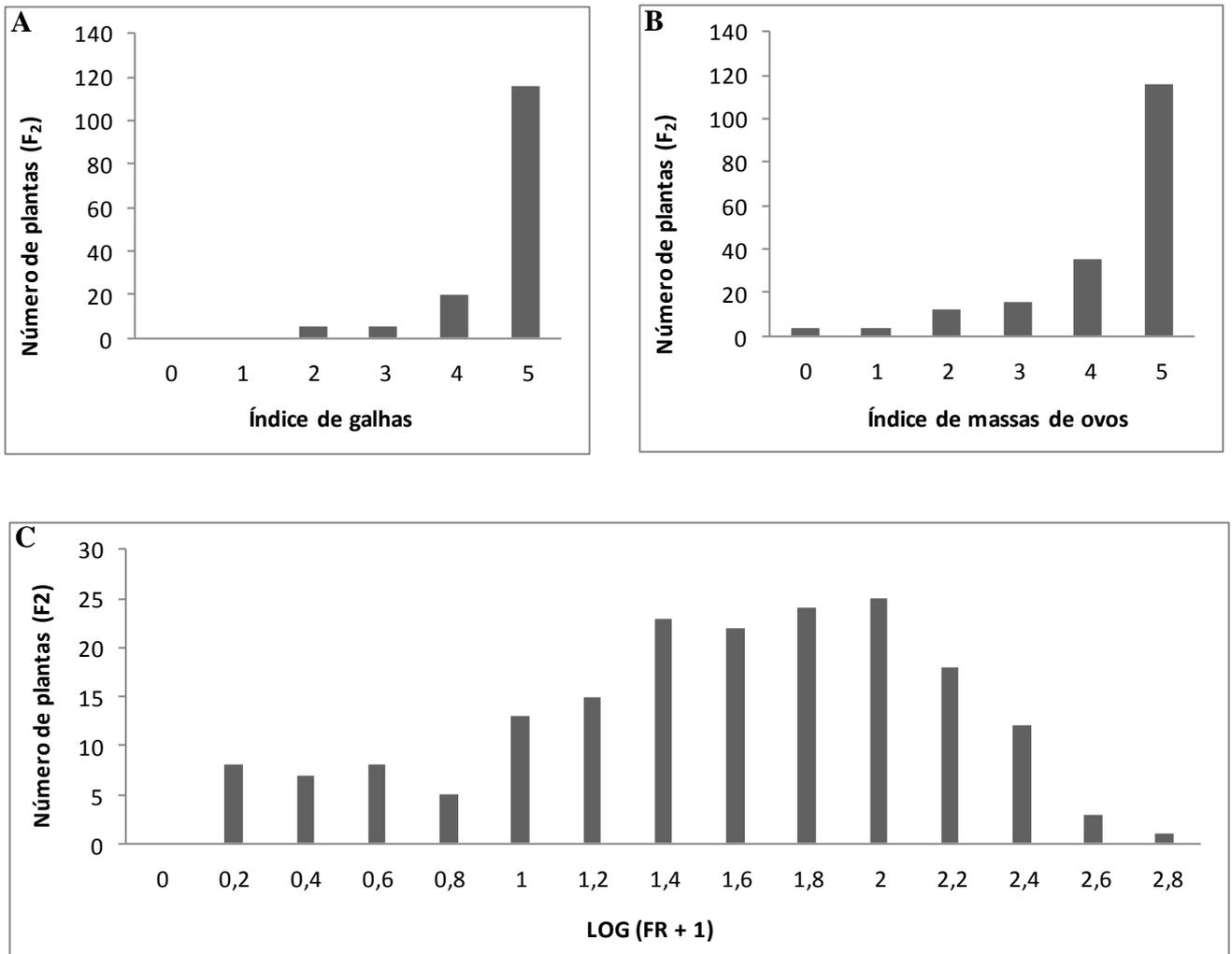
**Tabela 1** - Características do mapa genético obtido do cruzamento de algodoeiro FM966 (*G. hirsutum*) x CIR1348 (*G. barbadense*).

Cromossomo/ Grupo de ligação	Comprimento em cM	Número de locos
C1	147,8	12
C2	160	13
C3	192,6	12
C4	116	10
C5	159,7	9
C6	185	13
C7	187,2	10
C8	104	7
C9	181,2	11
C10	104,6	8
C11	211,8	13
C12	174,5	9
C13	52,8	3
C14	181,6	11
C15	170,3	13
C16	129,5	7
C17	171,4	12
C18	179,4	10
C19	241,3	14
C20	151,3	10
C21	200,7	17
C22	137,3	8
C23	204,8	13
C24	199,5	11
C25	116,6	7
C26	145,5	10
C3B	23,8	3
C5B	33,1	4
C14B	30,7	4

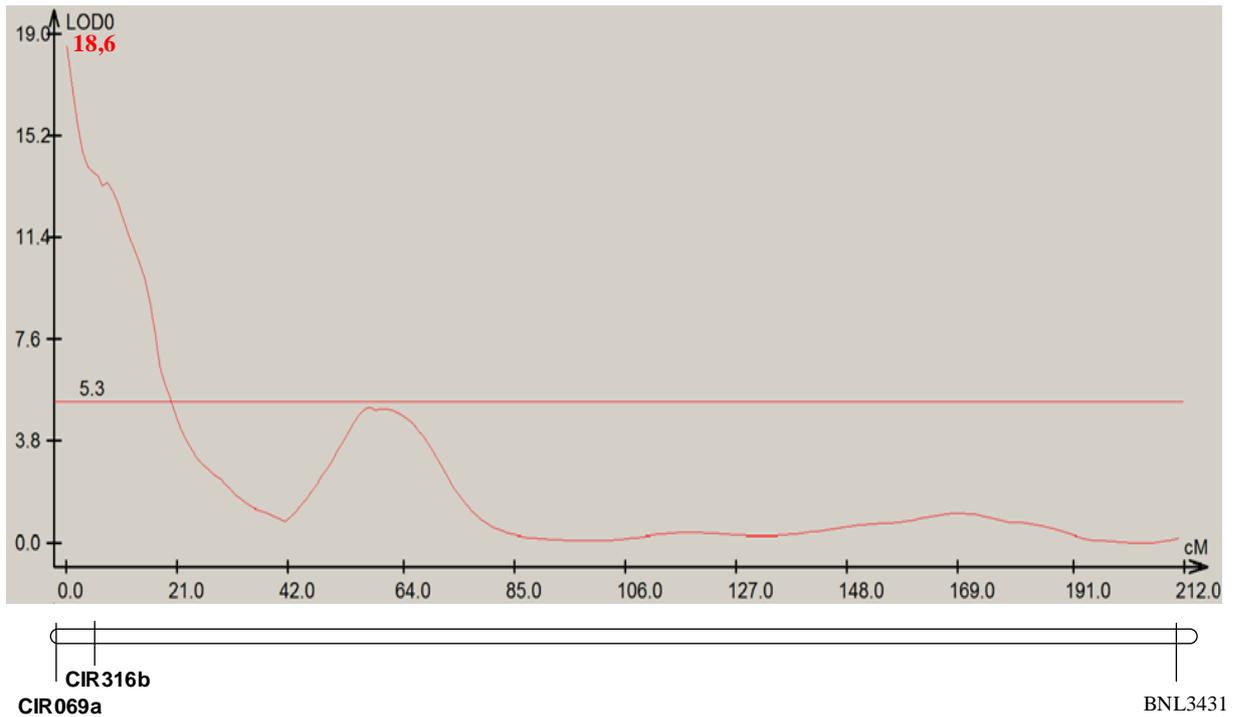
## **Análise de QTLs ligados à resistência do algodoeiro a *Meloidogyne incognita***

### **raça 3**

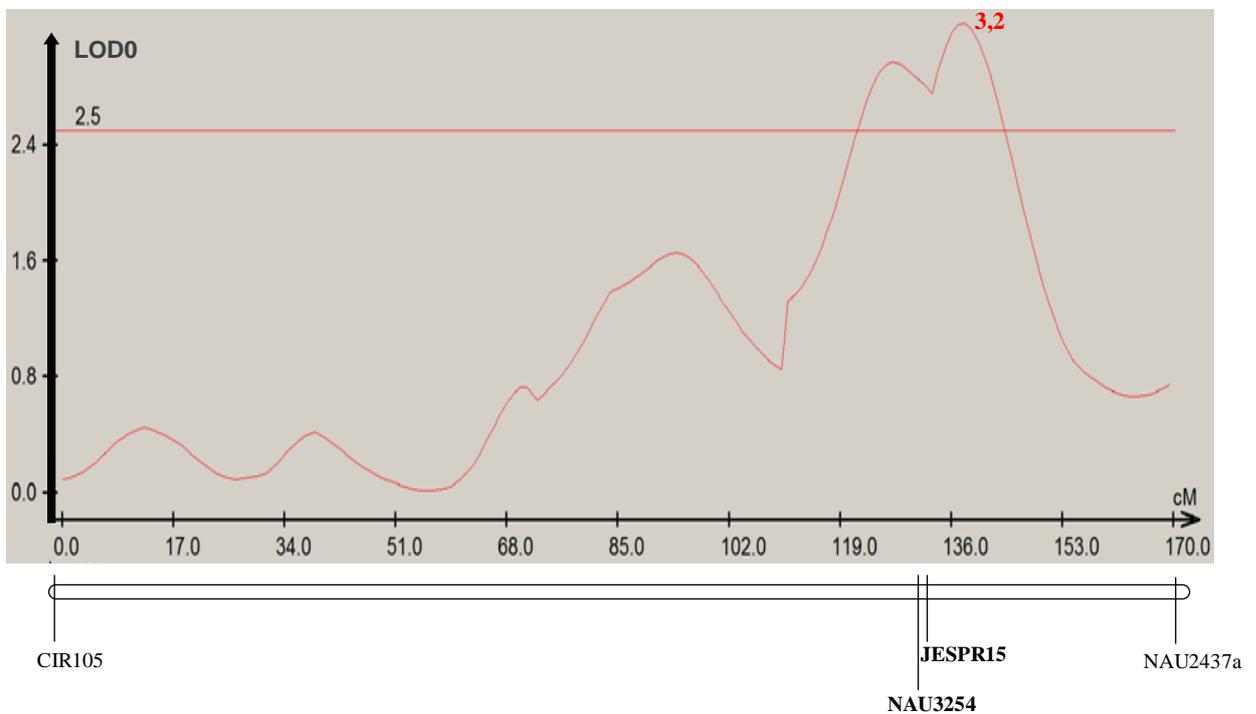
Um total de 180 plantas F<sub>2</sub> foi avaliado para verificar a resposta à infecção pelo nematoide das galhas, *M. incognita* raça 3. Essas plantas foram utilizadas para a identificação de QTLs ligados à resistência ao *M. incognita* raça 3. Para essa análise foram utilizadas três características ligadas à resistência ao nematoide: índice de galhas (IG), índice de massas de ovos (IMO) e fator de reprodução (FR). Os valores de IG e IMO obtidos das plantas F<sub>2</sub> não apresentaram distribuição normal (Figura 3). Tentativas de transformação dos dados foram feitas, sem sucesso. Com isso, os valores de LOD escore mínimos para considerar válidos os QTLs, obtidos por 1000 permutações, para essas duas características foram bastante altos (82,4 para IG e 27,1 para IMO) e nenhum QTL significativo foi detectado. Para FR, a transformação por Log (FR + 1) possibilitou a obtenção de uma distribuição mais próxima da normalidade (Figura 3). Um valor mínimo de LOD, obtido por 1000 permutações, de 5,3 foi obtido. Com isso, um QTL localizado no cromossomo 11 foi detectado, com LOD máximo de 18,6 (Figura 4 e Tabela 2). Além disso, um QTL foi observado no cromossomo 15, com LOD máximo igual a 3,2 (Figura 5 e Tabela 2). De acordo com Lander & Botstein (1989), valores mínimos de LOD entre 2 e 3 possibilitam uma taxa de detecção de falso-positivos de apenas 5%. Marcadores do grupo de ligação 15 também foram significativamente associados ao FR, usando-se a análise de mapeamento de marcas únicas, além de outros testes estatísticos realizados no CIRAD (dados não mostrados). Desta forma, o QTL identificado no cromossomo 15 também pode ser considerado significativo.



**Figura 3** – Distribuição do índice de galhas (A), do índice de massas de ovos (B) e do fator de reprodução de raça 3 (C) na população F<sub>2</sub> de algodoeiro (FM966 x CIR1348). Para se obter o índice de galhas e o índice de massas de ovos foi utilizada a seguinte escala: 0 = nenhuma galha ou massa de ovos; 1= 1-2 galhas ou massas de ovos, 2 = 3-10; 3 = 11-30; 4 = 31-100, 5= > 100 galhas ou massas de ovos (Hartman & Sasser, 1985). Os valores do fator de reprodução (FR) foram transformados em Log (FR+1). FR=PF/PI, sendo PF= população final e PI= população inicial, que é de 10.000 ovos/planta.



**Figura 4** - QTL detectado no cromossomo 11, ligado à resistência ao nematoide *Meloidogyne incognita* raça 3. Cada pico acima da linha horizontal, que indica o ponto de corte (LOD escore=5,3), representa um possível QTL.



**Figura 5** - QTL detectado no cromossomo 15, ligado à resistência do algodoeiro ao nematoide *Meloidogyne incognita* raça 3. O pico acima da linha horizontal, que indica o ponto de corte (LOD escore=2,5), representa um possível QTL.

**Tabela 2** – QTLs detectados para a característica resistência do algodoeiro ao nematoide *Meloidogyne incognita*, pelo método de mapeamento por intervalo composto.

GL <sup>a</sup>	Loco <sup>b</sup>	Posição <sup>c</sup>	LOD <sup>d</sup>	a <sup>e</sup>	d <sup>e</sup>	R <sup>2</sup> (%) <sup>f</sup>
<b>11</b>	<b>CIR069a/CIR316b</b>	<b>0,01</b>	<b>18,6</b>	<b>0,0636</b>	<b>-0,9507</b>	<b>9,39</b>
<b>15</b>	<b>JESPR152/NAU3254</b>	<b>138,01</b>	<b>3,2</b>	<b>0,0707</b>	<b>-0,4844</b>	<b>4,31</b>

<sup>a</sup>Grupo de ligação a que pertence o QTL.

<sup>b</sup>Marcadores adjacentes ao QTL.

<sup>c</sup>Posição no grupo de ligação, em cM, em que foi observado o maior valor de LOD score.

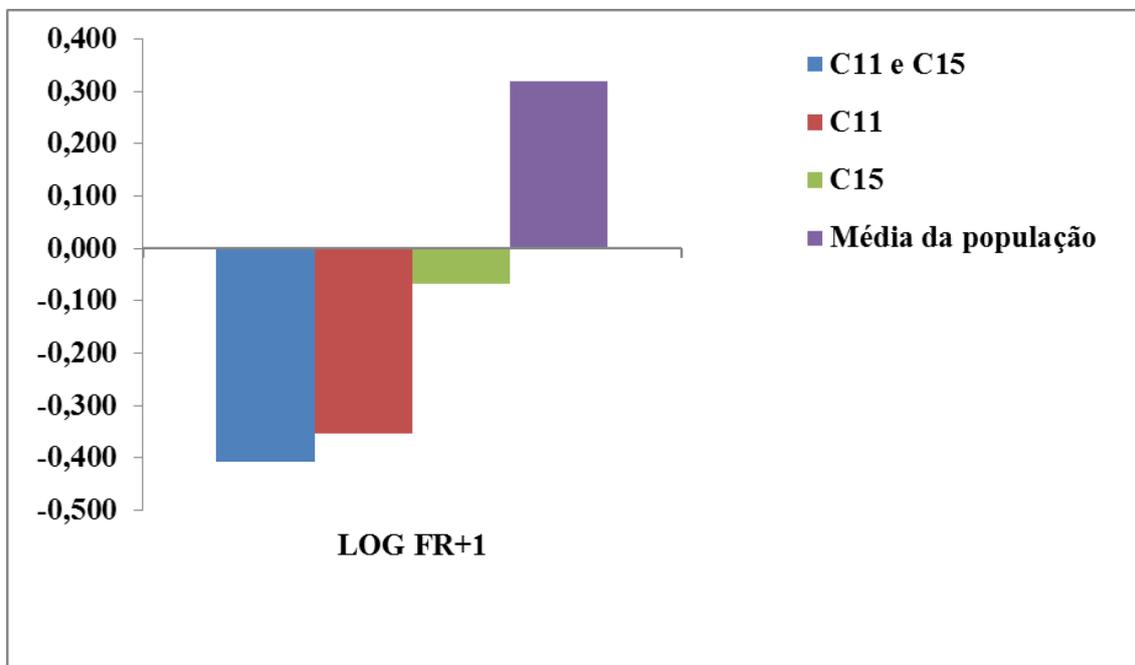
<sup>d</sup>LOD score máximo observado.

<sup>e</sup>Efeitos aditivo (a) e de dominância (d). O efeito aditivo refere-se ao efeito da substituição dos alelos de *G. hirsutum* FM 966 pelos alelos de *G. barbadense* CIR1348. Valor positivo indica aumento do valor da característica, que, nesse caso, significa um aumento da resistência ao nematoide. Para o efeito de dominância, valor positivo indica que o heterozigoto possui, em média, valor fenotípico superior à média dos dois homozigotos, sendo mais susceptível, e valor negativo indica que o heterozigoto possui, em média, valor fenotípico inferior à média dos dois homozigotos (mais resistente).

<sup>f</sup>Porcentagem da variação fenotípica explicada pelo marcador.

No cromossomo 11 foram identificados os locos CIR069a e CIR316b associados à resistência ao nematoide das galhas. No cromossomo 15, os locos JESPR152 e NAU3254 (Tabela 2). As porcentagens da variação fenotípica explicada (R<sup>2</sup>) pelos QTLs foram de 9,4% e 4,3%, para os grupos de ligação 11 e 15, respectivamente. Analisando esses dois QTLs associados à resistência ao nematoide, pode-se concluir que ambos têm efeito sobre a reprodução de *M. incognita* (Figura 6). Nessa figura, observa-se que a média do fator de reprodução das plantas F<sub>2</sub> que tinham os alelos da

espécie *G. barbadense* nos locos CIR069a e CIR316b, foi drasticamente reduzida (C11 - coluna vermelha, Figura 6) quando comparada com a média da população, ou seja, todas as plantas F<sub>2</sub> genotipadas (média da população – coluna na cor roxa - figura 06). Também houve redução do FR das plantas F<sub>2</sub> que tinham os alelos da espécie *G. barbadense* nos locos JESPR152 e NAU3254 (C15 - coluna verde, figura 6). O maior efeito na redução do FR foi observado nas plantas F<sub>2</sub> que possuíam os alelos da espécie *G. barbadense* nos locos CIR069a, CIR316b, JESPR152 e NAU3254 (C11 e C15 - coluna azul, figura 6).



**Figura 6** - Efeitos genéticos dos QTLs do cromossomo 11 (C11) e 15 (C15) do algodoeiro na supressão do fator de reprodução (log (FR+1)). C11 e C15 – média do log do FR+1 das plantas F<sub>2</sub> que possuem os alelos de *G. barbadense* nos locos CIR069a, CIR316b, JESPR152 e NAU3254; C11 – média do log do FR+1 das plantas F<sub>2</sub> que possuem os alelos de *G. barbadense* nos locos CIR069a e CIR316b; C15 - média do log do FR+1 das plantas F<sub>2</sub> que possuem os alelos de *G. barbadense* nos locos JESPR152 e NAU3254; Média da população - média do log do FR+1 de todas as plantas F<sub>2</sub>.

#### 4. DISCUSSÃO

O mapa genético construído neste trabalho, consistiu de 269 marcadores e 29 grupos de ligação, possui 313 locos e um tamanho de 4.294 cM. Entretanto, na construção do mapa HDC foram utilizados 6.669 marcadores, ou seja, praticamente todos os marcadores SSR publicados para o algodão (Blenda *et al.*, 2012). O mapa HDC é constituído de 26 cromossomos (grupos de ligação), possui 8.254 locos e tem o tamanho de 4.070 cM. Quando se comparam os dois mapas (o mapa produzido neste trabalho com o mapa HDC), observa-se que os tamanhos de ambos são similares, porém há diferenças no número de locos por grupo de ligação, no tamanho dos grupos e no ordenamento dos marcadores dentro dos grupos são observadas. Segundo Lacape e colaboradores (2009), tais diferenças podem ser devidas aos tamanhos das populações F<sub>2</sub> usadas, ao programa utilizado para construção dos mapas e ao número de marcadores usados para confecção dos mapas. Esses mesmos autores relataram que a distância total de um mapa gerado pelo JoinMap foi 28% menor do que o mapa gerado pelo MapMaker, ou seja, o programa JoinMap produz mapa com menor distância, em comparação com MapMaker. Rong e colaboradores (2004) desenvolveram um mapa genético para o algodão utilizando MapMaker 3.0 e JoinMap, que utilizam algoritmos diferentes, como consequência, os programas geraram mapas com tamanhos diferentes.

Fang & Yu (2012) adicionaram 455 locos em um mapa genético publicado por Yu *et al.* (2012). Com a adição desses novos locos, observaram-se mudanças na ordem dos marcadores e um erro de mapeamento que envolvia os cromossomos 19 e 22, sendo que no primeiro mapa um grupo de 16 locos estava mapeado no cromossomo 19 e no segundo mapa, após a adição dos novos locos, tal grupo foi mapeado no cromossomo 22.

A distância genética em centiMorgans do genoma do algodão tetraploide varia entre 3.380 cM (Yu *et al.*, 2012) e 5.454 cM (Zhang *et al.*, 2008). No entanto, o mapa produzido por Zhang *et al.* (2008) apresenta 44 grupos de ligação, assim, a distância total pode estar superestimada. Um mapa, produzido por Yu *et al.* (2011), encontrou uma distância genética total de 4.419 cM, mas, de acordo com Fang & Yu (2012) esta distância pode estar superestimada, pois há 35 intervalos maiores que 10 cM, sendo cinco destes maiores do que 20 cM.

### **Análise de QTLs**

O valor do fator de reprodução é bastante usado para definir plantas resistentes a nematoides (Roberts, 2002). Plantas resistentes apresentam valores de  $FR < 1$ . Das 174 plantas  $F_2$  usadas neste trabalho, 11 apresentavam  $FR < 1$ , que equivale a uma proporção de 1/16, a qual corresponde a um modelo de resistência genética regulada por dois genes recessivos. Este resultado também foi observado em um estudo anterior, no qual a frequência observada de plantas resistentes e suscetíveis apresentou valores que possibilitaram inferir que a resistência do acesso CIR1348 seja recessiva (Silva *et al.*, 2011).

O resultado observado nesse trabalho pela análise de QTLs, a qual indica a existência de dois genes (ou QTLs) de resistência, é semelhante ao resultado encontrado por Mota *et al.* (2012). Estes autores estudaram a fonte de resistência do acesso CIR1348 por meio da caracterização histopatológica da interação planta-nematoide, e observaram que esse acesso possui dois mecanismos de resistência pós-infectivos. O primeiro mecanismo de incompatibilidade atua após a penetração do nematoide nas raízes de algodão. Este mecanismo inicia como uma defesa bioquímica (reação de hipersensibilidade – RH) que bloqueia o desenvolvimento do J2 e a reprodução do

nematoide. O segundo mecanismo impede o desenvolvimento dos J3/J4 em fêmeas adultas e causam má formação das células gigantes e deformidades nos nematoides formados (Mota *et al.*, 2012).

A resistência do acesso Auburn 623 RNR (fonte de resistência mais estudada e utilizada), também parece ser conferida por dois genes (Ynturi *et al.*, 2006; McPherson *et al.*, 1995; Gutierrez *et al.*, 2010), sendo um dominante e o outro parcialmente dominante ou aditivo (McPherson, 1995; He *et al.*, 2014). Como a resistência conferida pelo CIR1348 é recessiva, sugere-se que o(s) gene(s) de resistência identificado neste trabalho seja diferente do(s) gene(s) do Auburn 623 RNR.

#### **Marcadores associados com a resistência em CIR1348**

Neste trabalho identificaram-se marcadores associados à resistência ao nematoide das galhas nos cromossomos 11 e 15. Várias referências indicam que o cromossomo 11 (Gutierrez *et al.*, 2010, Shen *et al.*, 2010) apresenta um QTL para resistência ao nematoide das galhas, mas, até a presente data, não há nenhuma referência relatando a presença de um QTL ligado à resistência a *M. incognita* no cromossomo 15.

Os locos CIR069a e CIR316b ligados ao QTL para resistência ao nematoide no cromossomo 11, foram identificados neste trabalho, esses locos foram encontrados em trabalhos anteriores, porém em acessos derivados de Auburn (Gutierrez *et al.*, 2010, Shen *et al.*, 2010). Vários autores identificaram um QTL no cromossomo 11 ligado à resistência ao nematoide das galhas (Gutierrez *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2006; 2010; Yajun, 2014) em Auburn 623 RNR, que se originou a partir de segregação transgressiva em um cruzamento entre dois pais moderadamente resistentes, Clevevilt 6 e México

Wild Jack Jones (Shepherd 1974 a, b). Dessa forma, tanto o acesso Auburn 623 RNR como o acesso CIR1348 apresentaram um QTL no cromossomo 11. Porém, não se pode concluir que os genes desses dois acessos nesse cromossomo sejam os mesmos. Para esclarecer a relação entre os genes (ou alelos de um mesmo gene) dessas duas fontes, seria necessário um estudo de uma população proveniente do cruzamento entre CIR1348 e Auburn 623RNR. He e colaboradores (2014) relatam que o QTL do cromossomo 11, proveniente do acesso Auburn 623 RNR, denominado de qMi-C11, possui maior efeito na diminuição do índice de galhas. Esses autores também identificaram nesse mesmo acesso um QTL no cromossomo 14, denominado de qMi-C14, que interfere na produção de ovos. Gutiérrez e colaboradores (2010) também encontraram dois genes de resistência em uma fonte derivada do Auburn 623 RNR. Estes autores relatam que o marcador CIR 316-201 está próximo do QTL localizado no cromossomo 11, e os marcadores BNL 3545-118 e BNL 3661-185 estão próximos do QTL do cromossomo 14. He e colaboradores (2014) sugerem que o gene do cromossomo 11, por impedir a formação de galhas, confere um mecanismo de defesa pós-penetração na forma de uma reação de hipersensibilidade, impedindo que o J2 estabeleça seu sítio de alimentação com a indução da formação das células gigantes. Já o gene de resistência do cromossomo 14, por diminuir a produção de ovos do nematoide, não inibe o estabelecimento do sítio de alimentação, mas confere uma resposta de hipersensibilidade retardada, contribuindo para uma má formação das células gigantes, o que impede o desenvolvimento e a produção de ovos da fêmea.

O QTL identificado no cromossomo 15, neste trabalho, é um resultado inédito, pois, até o momento, nenhum estudo relatou a existência desse QTL. Os marcadores JESPR152 e NAU3254, que estão próximos do QTL do cromossomo 15 ainda não

foram descritos como associados à resistência ao nematoide. Este resultado é de grande importância, pois com o uso desses marcadores pode-se realizar a seleção assistida em programas de melhoramento objetivando-se desenvolver cultivares de algodão mais resistentes a *M. incognita*. Por exemplo, na realização de piramidação de genes, a qual busca concentrar em um único genótipo, diferentes características de interesse (resistência a diferentes patógenos), além de reduzir o tempo necessário para obter esse genótipo.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, observa-se que o QTL do cromossomo 11 possui um maior efeito na diminuição da produção de ovos, quando comparado com o QTL do cromossomo 15 (Figura 6). Isso sugere que o QTL do cromossomo 11 é o principal responsável pela diminuição do número de ovos, não apresentando nenhum efeito na formação de galhas pelo nematoide. Já o QTL do cromossomo 15 propicia um efeito sinérgico juntamente com o QTL do cromossomo 11, diminuindo ainda mais o fator de reprodução, estes resultados são inéditos. O QTL do cromossomo 11, proveniente da fonte Auburn 623 RNR, é responsável por inibir a formação de galhas, resultado não observado neste trabalho.

O acesso *G. barbadense* CIR1348 é uma fonte de genes de resistência, pois possui alto nível de resistência ao nematoide das galhas. A identificação de um QTL no cromossomo 15 sugere que este gene seja uma nova fonte de resistência diferente das conhecidas até hoje. Mapeamento genético e análise de QTLs realizados neste estudo permitiram uma primeira caracterização genética desta fonte. Como o mapa obtido nesse trabalho não está totalmente saturado, é interessante adicionar mais marcadores para saturar as regiões de interesse e assim encontrar marcadores que estejam o mais próximos possível dos genes de resistência. Neste momento, não é possível saber se o

loco do cromossomo 11 encontrado no acesso CIR1348 é um gene diferente do encontrado em Auburn 623RNR. O estudo de uma grande população obtida a partir do cruzamento entre CIR1348 e Auburn 623RNR irá esclarecer a relação entre os genes ou alelos dessas duas fontes de resistência.

## 5 – Literatura citada

Anwar S.A. & Mckenry, M.V. 2007. Variability in Reproduction of Four Populations of *Meloidogyne incognita* on Six Cultivars of Cotton. *Journal of Nematology* 39:105-110.

Blenda, A.; Fang, D.D.; Rami J. F.; Garsmeur, O.; Luo, F. & Lacape, J. M. 2012. A High Density Consensus Genetic Map of Tetraploid Cotton That Integrates Multiple Component Maps through Molecular Marker Redundancy Check. *PLoS ONE*. 7(9): e45739. doi:10.1371/journal.pone.0045739.

Cook, C.G.; Robinson, A.F. & Namken, L.N. 1997. Tolerance to *Rotylenchulus reniformis* and resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in high-yielding breeding lines of upland cotton. *J Nematol* 29:322–328.

Churchill, G.A; Doerge, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, v.138, p.963–971, 1994.

Doerge, R.W. & Churchill, G.A. 1996. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics*, v.142, p.285–294.

Elliott, C.L.; Lewis, S.A. & Mueller, J.D. 1998. Galling of South Carolina *Meloidogyne incognita* populations on resistant cotton genotypes. In *Proceedings of the 1998 Beltwide Cotton Conference* (p.145). Memphis: National Cotton Council of America.

Fang, D.D. & Yu, J.Z. 2012. Addition of 455 Microsatellite Marker Loci to the High-Density *Gossypium hirsutum* TM-1 x *G. barbadense* 3-79 Genetic Map. *The Journal of Cotton Science* 16:229–248.

Guimarães, C.T.; Schuster, I.; Magalhães, J.V.de. & Souza Jr, C.L.de. 2006. Marcadores Moleculares no Melhoramento de Plantas. In: Borém, A.; Caixeta, E.T.. *Marcadores Moleculares*. Viçosa, MG: UFV. Cap. 4, p. 107-144.

Gutierrez, O.A.; Jenkins, J.N.; McCarty, J.C.; Wubben, M.J.; Hayes, R. & Callahan, F.E. 2010. SSR markers closely associated with genes for resistance to root-knot nematode on chromosomes 11 and 14 of Upland cotton. *Theor Appl Genetics* 121:1323–1337.

He, Y.; Kumar, P.; Shen, X.; Davis, R. F.; Becelaer, G. Van.; May, O. L.; Nichols, R.L. & Chee, P. W. 2014. Re-evaluation of the inheritance for root-knot nematode resistance in the Upland cotton germplasm line M-120 RNR revealed two epistatic QTLs conferring resistance *Theor Appl Genet* (2014) 127:1343–1351 DOI 10.1007/s00122-014-2302-2

Jones, J.E.; Dickson, J.I.; Aguiard, W.; Caldwell, W.D.; Moore, S.H.; Hutchinson, R.L. & Rogers, R.L. 1991. Registration of ‘LA 887’ cotton. *Crop Sci* 31:1701.

Lacape, J.M.; Jacobs, J.; Arioli, T.; Derijcker, R.; Forestier- Chiron, N.; Llewellyn, D.; Jean, J.; Thomas, E. & Viot, C. 2009. A new interspecific, *Gossypium hirsutum* × *G.barbadense*, RIL population: towards a unified consensus linkage map of tetraploid cotton. *Theor. Appl. Genet.*119:281–292.

Lander, E. S. & Botstein, D. 1989. Mapping Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits Using RFLP Linkage Maps. *Genetics* 121: 185-199 January.

Lander, E.S.; Green, P.; Abrahamson, J.; Barlow, A.; Daly, M.J. & Lincoln, S.E. 1987. Newburg, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations. *Genomics*, v.1, p.174-181.

McCall, L. 2003. Cotton variety ‘ST 5599BR’ U.S. Plant Variety Protection Certificate 200300279. Date issue: 24 June.

McPherson, M. G.; Jenkins, J. N.; McCarty, J. C. & Watson, C. E. 1995. Combining ability analysis of root-knot nematode resistance in cotton. *Crop Sci* 35:373–375.

McPherson, R.G.; Jenkins, J.N.; Watson, C & McCarty, J.C. 2004. Inheritance of root-knot nematode resistance in M-315 RNR and M78-RNR cotton. *J. Cotton Sci.* 8, 154—161.

Miles, L.E. 1939. Some tests of varietal susceptibility to a combination of root-knot nematode and cotton wilt. *Phytopathology* 29:974–978

Mota, F.; Alves, G.; Giband, M.; Gomes, A.; Sousa, F.; Mattos, V.; Barbosa, V.; Barroso, P.; Nicole, M. & Peixoto, J. 2012. New sources of resistance to *Meloidogyne*

incognita race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defence mechanisms. *Plant Pathol.* doi:10.1111/ppa.12022.

Niu, C.; Hinchliffe, D.J.; Cantrell, R.G.; Wang, C.; Roberts, P.A. & Zhang, J. 2007. Identification of molecular markers associated with rootknot nematode resistance in upland cotton. *Crop Sci* 47:951–960. doi:10.2135/cropsci2006.07.0499.

Oakley, S.R. 1995a. Acala C-225. A new nematode resistant Acala variety for California's San Joaquin Valley. In: Dugger CP, Richter DA (eds) Beltwide cotton prod res conf, January 4–7 1995 San Antonio, TX, USA. Natl Cotton Council of America, Memphis, TN, USA, p 39.

Oakley, S.R. 1995b. Cotton variety 'Acala Nem-X' U.S. Plant Variety Protection Certificate 9500225. Date issue: 29 October, 2001 Boethel D (1997) Cotton variety 'PM 1560 BG' U.S. Plant variety protection certificate 009700130. Date issue: 2 February.

Ogallo, J. L.; Goodell, P.B.; Eckert, J. & Roberts, P.A. 1997. Evaluation of NemX, a new cultivar of cotton with high resistance to *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 29(4): 531-537.

Roberts, P.A. 2002. Concepts and Consequences of Resistance. In: Starr JL, Cook R, Bridge J. *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. CAB International, Wallingford. pp. 25-41.

Robinson, A.F & Percival, A.E. 1997. Resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 and *Rotylenchulus reniformis* in wild accessions of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* from Mexico *Journal of Nematology* 29(4):746–755.

Robinson, A.F.; Cook, C.G. & Percival, A.E. 1999. Resistance to *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne incognita* race 3 in the major cotton cultivars planted since 1950. *Crop Sci* 39:850–858.

Robinson, A.F.; Bowman, D.T.; Cook, C.G.; Jenkins, J.N.; Jones, J.E.; May, L.O.; Oakley, S.R.; Oliver, M.J.; Roberts, P.A.; Robinson, M.; Smith, C.W.; Starr, J.L, Stewart. & McD, J. 2001. Nematode resistance. In: Kirkpatrick TL, Rothrock CS (Eds) *Compendium of Cotton Diseases*. St. Paul, Minnesota. pp. 68–79.

Rong, J.K.; Abbey, C.; Bowers, J.E.; Brubaker, C.L.; Chang, C.; P. Chee, W.; T.A.; Delmonte, X.; et al. 2004. A 3347-locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*). *Genetics* 166:389–417.

Santos, A.; Keim, D.L. & Shoemaker, D.B. 2009. Cotton cultivar DP 174 RF. U.S. Patent 7,638,686 B2, filed May 15, 2007, and issued December 29.

Silva, E. H; Carneiro, M.D.G.; Giband, M.; Barroso, P. V. A.; Furlanetto, C.; Carneiro, R. M. D. G. 2011. Estudo preliminar da herança da resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3 em algodoeiro. In: XXIX Congresso Brasileiro de Nematologia, 2011, Brasília-DF. Anais do XXIX congresso Brasileiro de Nematologia. Brasília - DF: Embrapa informação Tecnológica, 2011. v. 1. p. 202-203.

Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent label ling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.

Smith, A. L. 1954. Problems on breeding cotton for resistance to nematodes. *Plant Dis Rep Suppl* 227:90–91.

Shepherd, R. L. 1974a. Registration of Auburn 623 RNR cotton germplasm. *Crop Sci* 14:911.

Shepherd, R.L. 1974b. Transgressive segregation for root-knot nematode resistance in cotton. *Crop Sci* 14:872–875.

Shepherd, R.L. 1974. Breeding root-knot-resistant *Gossypium hirsutum* L. using a resistant wild *G. barbadense* L. *Crop Sci* 14:687– 691.

Shepherd, R.L. 1982. Registration of three germplasm lines of cotton (Reg. Nos. GP 164–166). *Crop Sci* 22:692.

Shepherd, R.L. 1983. New sources of resistance to root-knot nematodes among primitive cottons. *Crop Sci* 23:999–1002.

Shepherd, R.L.; McCarty, J.C.Jr.; Jenkins, J.N. & Parrott, W.L. 1988. Registration of twelve nonphotoperiodic lines with root-knot nematode resistant primitive cotton germplasm. *Crop Sci* 28:868–869.

Shen, X.; Van Becelaere, G.; Kumar, P.; Davis, R.F.; May, O.L & Chee, P. 2006. QTL mapping for resistance to root-knot nematodes in the M-120 RNR upland cotton line (*Gossypium hirsutum* L) of the Auburn 623 RNR source. *Theor Appl Genet* 113:1539–1549. doi:10.1007/s00122-006-0401-4.

Shen, X.L.; He, Y.J.; Lubbers, E.L.; Davis, R.F.; Nichols, R.L. & Chee, P.W. 2010. Fine mapping QMi-C11 a major QTL controlling rootknot nematodes resistance in upland cotton. *Theor Appl Genet* 121:1623–1631.

Starr, J.L.; Moresco, E.R.; Smith, C.W.; Nichols, R.L.; Roberts, P.A & Chee, P. 2010. Inheritance of Resistance to *Meloidoygne incognita* in Primitive Cotton Accessions from Mexico *Journal of Nematology* 42(4):352-8.

Turcotte, E.L.; Harold, W.R.; O'Bannon, J.H. & Feaster, C.V. 1963. Evaluation of cotton root knot nematode resistance of a strain of *G. barbadense* var. darwinni. In: 15th cotton improvement conference. January 8–9 1963 Dallas, TX, USA. National Cotton Council of America, Memphis, pp 36–44.

Voorrips, R.E. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *The Journal of Heredity*, v.93, p.77-78.

Wang, C.; Ulloa, M. & Roberts, P.A. 2006. Identification and mapping of microsatellite markers linked to a root-knot nematode resistance gene (*rkn1*) in Acala Nem-X cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Theor Appl Genet* 112:770–777. doi:10.1007/s00122-005-0183-0.

Wang, S.; Basten, C.J. & Zeng, Z. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. 2006. <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>

Wiles, A.B. 1957. Resistance to root knot nematode in cotton. *Phytopathology* 47:37

Yu, Y.; Yuan D.J.; Liang, S.G.; Li, X.M.; Wang, X.Q.; Lin, Z.X. & Zhang, X.L. 2011. Genome structure of cotton revealed by a genome-wide SSR genetic map constructed from a BC1 population between *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*. *BMC Genomics* 12:15.

Yu, J.Z.; Kohel, R.J.; Fang, D.D.; Cho, J.; Van Deynze, A.; Ulloa, M.; Hoffman, S.M.; Pepper, A.E.; Stelly, D.M.; Jenkins, J.N.; Saha, S.; Kumpatla, S.P.; Shah, M.R.; Hugie, W.V. & Percy, R.G. 2012b. A high-density simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism genetic map of the tetraploid cotton genome. *G3, Genes | Genomes Genetics*. 2:43–58. Available online [http://www.nespal.org/peng\\_lab/papers/John%20Z%20et%20al%202012.pdf](http://www.nespal.org/peng_lab/papers/John%20Z%20et%20al%202012.pdf) (verified 20 July 2012).

Ynturi P (2005) Phenotypic and genotypic study of root-knot nematode resistance in near isogenic lines of cotton. Thesis, Mississippi State University, Mississippi State, MS, USA

Ynturi, P.; Jenkins, J.N.; McCarty, J.C.; Gutiérrez, O.A. & Saha, S. 2006. Association of root-knot resistance genes with simple sequence repeat markers on two chromosomes in cotton. *Crop Sci.* 46:2670–2674.

Yu, J.Z.; Kohel, R.J.; Fang, D.D.; Cho, J.; Van Deynze, A.; Ulloa, M.; Hoffman, S.M.; Pepper, A.E.; Pepper, D.M. X.; Jenkins, J.N.; Saha, S.; Kumpatla, S.P.; Shah, M.R.; Hugie, W.V. & Percy, R.G. 2012. A high-density simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism genetic map of the tetraploid cotton genome. *G3, Genes | Genomes Genetics*. 2:43–58. Available online at [http://www.nespal.org/peng\\_lab/papers/John%20Z%20et%20al%202012.pdf](http://www.nespal.org/peng_lab/papers/John%20Z%20et%20al%202012.pdf) (verified 20 July 2012).

Zhang, Y.; Lin, Z.X.; Xia, Q.; Zhang, M. & Zhang, X.L. 2008. Characteristics and analysis of simple sequence repeats in the cotton genome based on a linkage map constructed from a BC1 population between *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*. *Genome* 51:534–546

Zhou, E.; Wheeler, T.A. & Starr, J.L. 2000. Root galling and reproduction of *Meloidogyne incognita* isolates from Texas on resistant cotton genotypes. *Journal of Nematology* 32(4S): 513-518.

# CONCLUSÕES GERAIS

---

---

As populações estudadas de *Meloidogyne incognita* patogênicas ao algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) apresentam baixa variabilidade genética, o que pode estar relacionado ao seu modo de reprodução partenogenética mitótica.

Nenhuma das cinco populações de *M. incognita* coletadas em diferentes áreas produtoras de algodão foi capaz de causar elevadas formações de galhas e massas de ovos, nem mesmo de apresentarem elevadas taxas de reprodução sobre os acessos resistentes de algodão TX-25, M-315 RNR, CIR1348, CIR1343 e Wild Mexican Jack Jones. Esses dados sugerem que a resistência desses acessos de algodão terá ampla aplicabilidade e será eficaz nas principais regiões produtoras de algodão do Brasil.

A identificação do QTL no cromossomo 15, encontrado no acesso *G. barbadense* CIR1348, sugere que este gene seja uma nova fonte de resistência, diferente das conhecidas até hoje.

Os marcadores CIR069 e CIR316 estão próximos ao QTL do cromossomo 11, e os marcadores, JESPR152 e NAU3254, estão próximos do QTL do cromossomo 15 e podem ser utilizados para realizar a seleção assistida.

O conhecimento gerado por meio deste estudo é uma contribuição importante visando ao uso de uma nova fonte de resistência ao nematoide das galhas.

# ANEXOS

## ANEXO 1

Tabela com os resultados da fenotipagem, dividida por bloco com descrito no capítulo 3. Os dados dessa tabela estão descritos na seguinte ordem: Genótipo (F<sub>2</sub>, os parentais e controle), repetição do genótipo, peso da raiz em gramas, índice de galhas, índice de massas de ovos, número de ovos em três repetições, média do número de ovos, diluição realizada para procedimento da contagem dos ovos e o fator de reprodução (FR) que é calculado dividindo a população final pela população inicial que é de 10.000 ovos.

### Bloco 1

Genótipo	Repe	Peso Raíz (g)	Índice galhas	Índice MO	N° de ovos			Média	Diluição	FR
F 2	R 1	72	5	5	121	122	121	121	10	12
	R 2	182	5	5	64	77	69	70	55	39
	R 3	32	5	5	113	103	115	110	10	11
	R 4	140	5	5	58	64	67	63	30	19
	R 5	123	5	4	67	68	56	64	10	6
	R 6	115	4	4	124	128	130	127	15	19
	R 7	178	5	4	72	87	74	78	20	16
	R 8	87	5	4	69	81	94	81	10	8
	R 9	190	5	4	68	71	72	70	25	18
	R 10	116	5	5	162	172	165	166	60	100
F 2	R 11	53	5	5	290	295	292	292	20	58
	R 12	75	5	5	529	537	541	536	10	54
	R 13	51	4	2	3	2	3	3	10	0,3
	R 14	48	5	5	234	246	248	243	20	49
	R 15	105	5	4	134	115	120	123	15	18
	R 16	124	5	5	73	86	80	80	35	28
	R 17	75	5	5	132	139	136	136	50	68
	R 18	110	4	4	84	73	77	78	15	12
	R 19	40	5	5	67	70	66	68	30	20
	R 20	280	5	5	341	330	338	336	70	235
F 2	R 21	81	5	5	133	154	149	145	40	58
	R 22	137	5	5	208	212	210	210	20	42
	R 23	40	5	5	354	376	349	360	3	11
	R 24	79	5	4	36	32	33	34	20	7
	R 25	32	5	5	101	99	104	101	10	10
	R 26	74	5	5	672	693	707	691	10	69
	R 27	84	4	4	218	220	217	218	3	7
	R 28	67	5	5	360	347	355	354	80	283
	R 29	153	5	5	94	98	96	96	40	38
	R 30	151	4	3	99	99	87	95	10	10

## Bloco 2

Genótipo	Repe	Peso Raíz (g)	Índice galhas	Índice MO	Nº de ovos			Média	Diluição	FR
F 2	R 31	69	5	5	85	92	87	88	20	17,6
	R 32	14	4	3	15	19	18	17	10	1,7
	R 33	67	5	5	277	281	280	279	40	112
	R 34	212	5	5	280	286	283	283	10	28
	R 35	114	5	5	292	299	307	299	15	45
	R 36	96	5	5	211	217	221	216	20	43
	R 37	179	5	5	233	206	213	217	30	65
	R 38	172	5	5	269	275	276	273	30	82
	R 39	87	5	4	156	167	171	165	10	16
	R 40	105	5	4	205	210	205	207	10	21
F 2	R 41	59	5	4	160	164	166	163	10	16
	R 42	63	5	5	38	43	45	42	20	8
	R 43	59	5	5	248	246	238	244	10	24
	R 44	44	5	4	145	127	119	130	5	7
	R 45	96	5	5	343	327	339	336	30	101
	R 46	106	5	5	305	314	311	310	10	31
	R 47	65	5	5	396	375	382	384	15	58
	R 48	98	4	2	4	7	7	6	15	0,9
	R 49	24	5	4	34	33	33	33	10	3,3
	R 50	94	2	2	1	0	1	1	10	0,1
F 2	R 51	102	5	5	195	213	215	208	20	42
	R 52	56	2	2	2	1	2	2	10	0,2
	R 53	161	5	4	448	439	453	447	15	67
	R 54	85	5	3	18	17	17	17	10	2
	R 55	132	5	5	290	280	295	288	55	159
	R 56	102	5	5	109	98	105	104	20	21
	R 57	86	5	5	153	160	158	157	30	47
	R 58	38	4	3	124	127	130	127	5	6
	R 59	127	5	5	149	159	154	154	50	77
	R 60	175	5	5	536	547	539	541	40	216

### Bloco 3

Genótipo	Repe	Peso Raíz (g)	Índice galhas	Índice MO	Nº de ovos			Média	Diluição	FR
F 2	R 61	84	5	4	204	196	198	199	10	20
	R 62	64	5	5	132	127	123	127	20	25
	R 63	77	5	5	284	262	273	273	20	55
	R 64	113	5	5	246	238	256	247	50	123
	R 65	125	3	3	24	18	16	19	15	2,9
	R 66	94	5	5	493	457	479	476	40	191
	R 67	98	5	5	249	260	263	257	40	103
	R 68	90	5	5	253	237	248	246	40	98
	R 69	102	5	5	108	116	113	112	30	34
	R 70	104	5	5	136	126	130	131	60	78
F 2	R 71	61	5	4	55	46	47	49	20	10
	R 72	77	5	5	397	388	393	393	20	79
	R 73	105	4	4	54	60	60	58	30	17
	R 74	76	5	5	195	218	208	207	40	83
	R 75	66	5	5	136	128	131	132	20	26
	R 76	73	5	5	41	37	40	39	30	12
	R 77	85	5	4	210	195	205	203	30	61
	R 78	54	4	3	47	61	52	53	10	5
	R 79	95	4	3	8	10	9	10	10	1
	R 80	28	5	5	247	246	241	245	50	122
F 2	R 81	68	4	3	48	45	43	45	5	2
	R 82	42	4	3	12	12	14	13	15	2
	R 83	46	5	5	123	122	125	123	20	25
	R 84	121	4	2	35	24	28	29	30	9
	R 85	91	5	5	421	437	441	433	50	217
	R 86	45	5	5	180	177	179	179	30	54
	R 87	109	5	5	278	263	259	267	40	107
	R 88	160	5	5	407	415	409	410	100	410
	R 89	124	5	5	465	472	470	469	50	235
	R 90	105	5	5	155	186	171	171	80	137

## Bloco 4

Genótipo	Repe	Peso Raiz (g)	Índice galhas	Índice MO	Nº de ovos			Média	Diluição	FR
F 2	R 91	81	5	5	370	365	374	370	10	37
	R 92	33	5	5	208	218	215	214	20	43
	R 93	53	5	5	201	211	207	206	50	103
	R 94	169	5	5	217	222	219	219	50	110
	R 95	37	5	5	169	195	188	184	10	18
	R 96	115	5	5	459	453	441	451	50	226
	R 97	69	5	5	278	275	277	277	30	83
	R 98	51	5	4	55	48	41	48	20	10
	R 99	59	5	5	229	218	228	225	30	68
	R 100	39	5	5	65	67	69	67	30	20
F 2	R 101	101	4	4	123	135	127	128	15	19
	R 102	144	5	5	298	308	300	302	100	302
	R 103	64	5	5	136	159	144	146	20	29
	R 104	120	2	2	3	3	2	3	10	0,3
	R 105	96	5	4	220	216	211	216	5	11
	R 106	125	3	2	6	10	6	7	10	0,7
	R 107	30	4	4	58	57	56	57	10	6
	R 108	99	5	5	448	450	466	455	50	227
	R 109	31	5	5	118	107	100	108	30	33
	R 110	138	5	2	44	42	40	42	10	4,2
F 2	R 111	74	5	5	184	179	181	181	20	36
	R 112	76	5	5	418	399	407	408	20	82
	R 113	152	5	5	232	242	239	238	20	48
	R 114	95	5	4	79	76	78	78	30	23
	R 115	117	5	5	143	152	143	146	50	73
	R 116	85	5	5	411	421	417	416	50	208
	R 117	82	5	5	274	280	284	279	25	70
	R 118	62	5	5	58	64	65	62	30	19
	R 119	117	4	2	13	15	13	14	10	1,4
	R 120	106	5	5	300	260	271	277	55	152

## Bloco 5

Genótipo	Repe	Peso Raíz (g)	Índice galhas	Índice MO	Nº de ovos			Média	Diluição	FR
F 2	R 121	153	5	5	113	100	106	106	30	32
	R 122	219	5	5	104	109	105	106	60	64
	R 123	128	4	2	13	13	14	13	15	2,0
	R 124	181	5	5	96	92	94	94	50	47
	R 125	60	5	3	6	10	10	9	10	0,9
	R 126	51	4	4	48	49	49	49	27	13
	R 127	73	5	5	206	200	199	202	50	101
	R 128	99	5	5	243	251	249	248	20	50
	R 129	162	5	5	715	736	721	724	50	362
	R 130	124	5	5	183	176	181	180	45	81
F 2	R 131	51	2	1	15	20	18	18	10	1,8
	R 132	25	5	5	73	61	70	68	25	17
	R 133	45	5	5	105	100	110	105	10	11
	R 134	55	5	5	132	128	130	130	30	39
	R 135	98	5	5	298	303	300	300	50	150
	R 136	199	5	5	320	310	305	312	55	171
	R 137	65	5	4	91	98	94	94	10	9
	R 138	60	5	5	286	278	270	278	40	111
	R 139	96	5	5	219	208	211	213	20	43
	R 140	121	5	4	71	84	77	77	15	12
F 2	R 141	116	5	5	215	207	209	210	30	63
	R 142	121	5	5	271	277	270	273	40	109
	R 143	38	2	2	7	10	8	8	5	0,4
	R 144	38	3	3	11	10	10	10	10	1,0
	R 145	125	5	5	108	106	103	106	35	37
	R 146	82	5	5	392	377	385	385	40	154
	R 147	46	5	5	344	339	352	345	20	69
	R 148	80	5	5	401	385	397	394	50	197
	R 149	78	5	5	209	215	207	210	20	42
	R 150	85	5	5	358	340	349	349	60	209

## Bloco 6

Genótipo	Repe	Peso Raíz (g)	Índice galhas	Índice MO	Nº de ovos			Média	Diluição	FR
F 2	R 151	90	5	5	217	206	206	210	35	73
	R 152	80	5	5	233	241	237	237	10	24
	R 153	124	5	5	176	183	170	176	50	88
	R 154	140	5	5	89	93	88	90	55	50
	R 155	95	5	5	117	115	114	115	30	35
	R 156	124	3	1	9	6	7	7	10	0,7
	R 157	116	5	5	329	318	321	323	60	194
	R 158	316	5	5	156	144	146	149	60	89
	R 159	155	5	3	14	13	14	14	10	1,4
R 160	127	5	5	454	479	483	472	20	94	
F 2	R 161	171	5	5	196	191	193	193	30	58
	R 162	133	5	4	60	66	70	65	15	10
	R 163	73	5	4	112	115	110	112	15	17
	R 164	42	1	0	6	6	5	6	10	0,6
	R 165	106	4	4	38	45	48	44	15	7
	R 166	108	5	5	213	228	238	226	50	113
	R 167	114	5	5	166	168	167	167	35	58
	R 168	123	5	5	199	205	203	202	40	81
	R 169	77	5	5	293	290	287	290	15	44
R 170	65	5	5	124	130	126	127	20	25	
F 2	R 171	180	5	5	211	229	218	219	30	66
	R 172	114	5	4	192	186	185	188	10	19
	R 173	145	5	4	32	28	30	30	30	9
	R 174	96	5	5	343	332	341	339	30	102
	R 175	148	5	5	67	50	58	58	60	35
	R 176	85	5	5	140	150	142	144	30	43
	R 177	63	5	5	292	297	301	297	60	178
	R 178	90	2	0	2	2	1	2	5	0,1
	R 179	73	4	3	25	30	21	25	10	2,5
R 180	92	5	5	131	139	135	135	15	20	

### Planilha com os resultados dos parentais e do controle

Genótipo	Rep	Peso	Índice galhas	Índice MO	Nº de ovos por ml			Média	Diluição	FR
Testemunha FM966	1	38	5	5	187	173	179	180	20	36
	2	83	5	5	200	196	201	199	75	149
	3	95	5	5	348	364	357	356	20	71
	4	91	5	5	144	122	136	134	60	80
	5	62	5	5	119	105	116	113	30	34
	6	55	5	5	116	146	156	139	40	56
	7	135	5	5	182	181	187	183	30	55
	8	99	5	5	200	189	210	200	60	119,8
Resistente Algodon del Pais nº 3	1	120	3	0	1	1	1	1	10	0,10
	2	85	3	0	1	0	1	1	15	0,10
	3	70	3	2	2	2	1	2	10	0,17
	4	149	2	0	2	2	2	2	10	0,20
	5	189	3	0	19	15	13	16	5	0,78
	6	136	2	1	1	1	2	2	20	0,40
	7	155	2	0	1	0	1	1	20	0,13
FM 966 X Algodon del Pais – F1	1	29	5	5	124	114	122	120	10	12
	2	22	5	4	58	57	59	58	20	12
	3	30	4	4	149	147	146	147	5	7,37
	4	78	5	5	217	222	221	220	10	22
	5	72	5	4	76	89	86	84	15	12,55
	6	74	5	5	220	223	224	222	10	22,23
	7	77	5	5	158	154	155	156	15	23,35
	8	31	4	4	38	36	38	37	15	5,6
Deta Opal	1	116	5	5	217	188	191	199	20	40
	2	175	5	5	46	44	43	44	50	22
	3	121	5	4	149	144	150	148	25	37
	4	300	5	5	38	47	44	43	50	22
	5	153	4	2	110	99	102	104	30	31
	6	185	5	5	43	45	42	43	50	22
	7	165	4	3	25	16	15	19	15	2,8
LA 887	1	256	5	3	14	20	17	17	25	4
	2	170	5	5	12	14	13	13	25	3
	3	233	5	3	15	16	15	15	20	3
	4	138	5	3	55	45	47	49	10	5
	5	218	4	1	10	8	9	9	15	1,4
	6	158	5	5	33	25	27	28	25	7
	7	129	2	0	4	2	3	3	10	0,3
M 315	1	173	3	0	2	1	1	1	10	0,13
	2	158	2	2	1	1	1	1	10	0,1
	3	105	4	2	3	5	4	4	15	0,6
	4	158	2	2	1	0	1	1	20	0,1
	5	136	1	0	1	1	0	1	20	0,1
	6	137	2	1	2	0	0	1	20	0,1
	7	155	2	1	1	0	1	1	25	0,2

*Genetic variability and virulence of  
Meloidogyne incognita populations from  
Brazil to resistant cotton genotypes*

**Esdras Henrique da Silva, Vanessa da  
Silva Mattos, Cleber Furlaneto, Marc  
Giband, Paulo Augusto Vianna Barroso,  
Antônio Williams Moita, et al.**

**European Journal of Plant Pathology**

Published in cooperation with the  
European Foundation for Plant  
Pathology

ISSN 0929-1873

Eur J Plant Pathol  
DOI 10.1007/s10658-014-0381-1



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by KNPV. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**

# Genetic variability and virulence of *Meloidogyne incognita* populations from Brazil to resistant cotton genotypes

Esdras Henrique da Silva · Vanessa da Silva Mattos · Cleber Furlaneto · Marc Giband · Paulo Augusto Vianna Barroso · Antônio Williams Moita · Aldemiro Jorge-Junior · Valdir Ribeiro Correa · Philippe Castagnone-Sereno · Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro

Accepted: 2 January 2014  
© KNPV 2014

**Abstract** The root-knot nematode *Meloidogyne incognita* is widely distributed and a major pathogen of cotton (*Gossypium* spp.) worldwide. The objectives of this study were to assess the genetic variability and aggressiveness of Brazilian populations of *M. incognita* in cotton. Five populations of *M. incognita* and one isolate

of *M. enterolobii* (outgroup) were used in the molecular analysis. Our results showed that only 2.7 % of the RAPD and AFLP fragments were polymorphic. Despite the existence of two races (races 3 and 4) and two esterase phenotypes (I1 and I2), a low genetic variability among populations was observed, which might be due to the mitotic parthenogenetic mode of reproduction of this pathogen. The aggressiveness/virulence among populations towards different cotton genotypes was also studied. None of the populations was virulent to the resistant cotton genotypes M-315 RNR, TX-25, CIR1343, Wild Mexican Jack Jones and CIR1348 (reproduction factor <1). Two populations of *M. incognita* from the states of Mato Grosso do Sul and Parana (Umuarama) (races 4 and 3, respectively) were highly aggressive to the susceptible control FM966 and virulent to the accessions LA-887 and Cleve-wilt-6 that showed moderate resistance to other populations tested.

Esdras Henrique da Silva and Vanessa da Silva Mattos contributed equally to this work.

E. H. da Silva · V. da Silva Mattos · A. Jorge-Junior · V. R. Correa · R. M. D. G. Carneiro (✉)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,  
Brasília, DF 70849-970, Brazil  
e-mail: regina.carneiro@embrapa.br

E. H. da Silva · V. da Silva Mattos · C. Furlaneto · V. R. Correa  
Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília,  
Brasília, DF 70910-900, Brazil

P. A. V. Barroso  
Núcleo Cerrado da Embrapa Algodão,  
Santo Antônio de Goiás, GO 75375-000, Brazil

A. W. Moita  
Embrapa- Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças,  
Brasília, DF 70359-970, Brazil

M. Giband  
Cirad, UMR AGAP,  
Avenue Agropolis, 34398 Montpellier, France

P. Castagnone-Sereno  
INRA-UMR 1355, UNS, CNRS-UMR 7254, Institut Sophia  
Agrobiotech,  
400 route des Chappes, BP167, 06903 Sophia Antipolis,  
France

**Keywords** AFLP · *Gossypium* spp. · RAPD · RKN management · Resistance · Pathogenicity

## Introduction

The root-knot nematode (RKN) *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood 1949 is widespread and a major pathogen in cotton (*Gossypium hirsutum* L) production areas worldwide (Starr et al. 2005), causing direct damage and increasing the incidence and severity of other root diseases, in particular *Fusarium* wilt, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp.

*vasinfectum* (Atk.) Snyder. Hans (Jeffers and Roberts 1993; Abawi and Chen 1998). RKN host races 3 and 4 are able to parasitize cotton in the USA (Veech and Starr 1986) and in Brazil (M. Inomoto, personal communication).

Efficient RKN management may be achieved through the use of resistant varieties which help control the disease and maintain crop yield, while decreasing nematode populations in the soil and protecting the following crops (Ruano et al. 1997; Davis and Kemeraït 2009). Nevertheless, repeated exposure of nematodes to resistant varieties may induce the emergence of resistance-breaking isolates, which may occur in a few generations (Netscher 1977; Janssen et al. 1998). In addition to the development of virulence under selective conditions, naturally resistance-breaking field populations, not exposed previously to resistant cultivars, have been observed (Roberts and Thomason 1989). The parthenogenetic RKN species exhibit a high capacity to respond to environmental selection, and their ability to overcome plant resistance genes has been demonstrated (Roberts 1995; Castagnone-Sereno 2002; Castagnone-Sereno et al. 2007). Virulence selection in nematode populations after successive expositions to resistant crop varieties has been reported especially against the *Mi* resistance gene in tomato (Roberts 1992, 1995) or cowpea genotypes with the *Rk* resistance gene (Roberts et al. 1995). In cotton, selection of isolates with increased reproduction on resistant varieties has been demonstrated (Ogallo et al. 1997). Resistance based on the deployment of a single or a few genes may be more prone to resistance break-down. At present, cotton breeding for RKN resistance relies on a limited number of sources of resistance, with only a small number of genes involved (Robinson et al. 2001; McPherson et al. 2004; Starr et al. 2010). Furthermore, variability in the virulence of RKN isolates on resistant cotton genotypes has been demonstrated (Elliott et al. 1998; Zhou et al. 2000; Anwar and McKenry 2007). These observations point out to the need for identifying novel sources of resistance and increasing the number of useful genes. They also point out to the need for better documenting the extent of variability of the aggressiveness or virulence of RKN populations from different cotton-producing regions towards resistant and tolerant genotypes.

The development of molecular techniques has opened new prospects for species identification and for the study of intraspecific variability of RKNs (Currant et al. 1986; Castagnone-Sereno et al. 1991, 1993).

Neutral molecular markers, such as RAPD, AFLP and ISSR, have been used to analyze the genetic diversity of *Meloidogyne* species (Castagnone-Sereno et al. 1994; Blok et al. 1997; Semblat et al. 1998; Randig et al. 2002; Carneiro et al. 2004, 2008; Fargette et al. 2005; Muniz et al. 2008; Santos et al. 2012). In cotton, studies on the variability of aggressiveness or virulence among RKN populations are still scarce (Elliott et al. 1998; Zhou et al. 2000; Anwar and McKenry 2007), and no reports are available on the extent of the genetic variability of *M. incognita* cotton isolates. We have recently identified accessions of *Gossypium* spp. that were highly resistant to a Brazilian isolate of *M. incognita* race 3 from Londrina, Paraná State (Mota et al. 2013), that represent novel sources of resistance to RKNs in cotton. In the present study, we show that despite having a low level of genetic diversity, *M. incognita* populations from the major cotton-producing regions in Brazil show variability in virulence towards moderately resistant cotton genotypes. We also show that none of the nematode populations studied were able to reproduce on the highly resistant accessions identified in our previous study, confirming their usefulness as a source of durable resistance to RKN.

## Materials and methods

### Identification of nematode species and races

Five populations of *M. incognita* pathogenic to cotton (*Gossypium* spp.) were obtained from cotton fields from different regions in Brazil (Table 1). They were specifically identified using esterase (Est) and malate dehydrogenase (MDH) phenotypes according to a standard procedure (Carneiro and Almeida 2001). Races of *M. incognita* were determined according to Hartman and Sasser (1985). A population of *M. enterolobii* was used as an outgroup in the diversity analysis.

### Egg extraction and DNA preparation

The extraction of eggs for DNA purification was done according to Carneiro et al. (2004). Total genomic DNA was extracted from ~200 to 300  $\mu$ l of nematode eggs that had been stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before use, as described by Randig et al. (2002). Isolated DNA was re-suspended in Milli-Q water, quantified in a 1 % agarose gel and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Table 1** List of *Meloidogyne* spp. populations and their isozyme phenotypes from different regions in Brazil used in this study

Species/Race	Population code	Geographic origin <sup>b</sup>	Phenotypes <sup>a</sup>	
			Est	Mdh
1) <i>M. incognita</i> Race 4	MT-R4	Campo Verde - MT	I2	N1
2) <i>M. incognita</i> Race 3	PR-R3 (LON)	Londrina - PR	I1	N1
3) <i>M. incognita</i> Race 3	PR-R3 (UMU)	Umuarama - PR	I2	N1
4) <i>M. incognita</i> Race 3	MTS-R3	Dourados - MS	I2	N1
5) <i>M. incognita</i> Race 3	BA-R3	Luís Eduardo Magalhães - BA	I2	N1
6) <i>M. enterolobii</i>	MENT	Petrolina - PE	VS1-S1	N1

<sup>a</sup>Est esterase, *Mdh* malate dehydrogenase

<sup>b</sup>Brazilian States

### Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis

The RAPD reactions were performed in a volume of 13 µl containing 9 ng of genomic DNA, using the PCR conditions described by Carneiro et al. (2008). The following 22 random 10-mer oligonucleotide primers (Operon Technologies, Alameda-Ca, USA) were used in the analysis, including A18, B01, B06, B12, C09, D05, D13, D20, E18, G03, G05, J10, J19, K04, K07, K16, L08, M20, N10, P02, R04 and R07. Amplification products were separated by agarose gel electrophoresis as previously described (Randig et al. 2002).

### Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis

The amplification reactions were performed in a 13 µl volume containing 9 ng of genomic DNA, using the PCR conditions described by Carneiro et al. (2008). The following 9 ISSR primers (Integrated DNA Technologies, Belo Horizonte, Brazil) were used: (CA)<sub>8</sub>, (AC)<sub>8</sub>, (CCA)<sub>5</sub>, (CA)<sub>8</sub> CTCT T, (GT)<sub>8</sub>YA, (GACA)<sub>4</sub> and (GTC)<sub>6</sub>. Amplification products were separated by agarose gel electrophoresis as previously described (Randig et al. 2002).

### Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis

For each sample, approximately 1 µg of genomic DNA was digested with *EcoRI* and ligated to *EcoRI* adaptors in a 20 µl volume and incubated overnight at 37 °C (Suazo and Hall 1999). The digestion-ligation reactions were diluted with Tris EDTA buffer to a final volume of 200 µl and stored at -20 °C. A series of thirteen 19-mer primers (Integrated DNA Technologies) were used, consisting of the *EcoRI* adapter core sequence GACT

GCGTACCAATTCAGT plus the 3' selective nucleotides AGT, ACT, ATT, GGC, CAG, TGG, CCT, ACC, GCC, CGA, CTC, CAT and CCG. Amplification products were separated by electrophoresis as previously described (Semblat et al. 1998).

### Phylogenetic analysis

For each type of marker, amplified bands were scored as present or absent from the digitized photographs of the gels, and DNA fingerprints of the populations were converted into a binary matrix. Phylogenetic reconstruction was performed using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) algorithm implemented in PAUP\* version 4b10 (Swofford 2002). The data were assumed to be unordered with no a priori weighting. For all analyses, 1,000 bootstrap replicates were performed to test the node support of the generated trees. Moreover, as the AFLP and RAPD markers amplified here could reasonably be considered as independent characters, the datasets that exhibited polymorphism between populations were combined to run a global UPGMA analysis, according to the total-evidence approach (Huelsenbeck et al. 1996), using the same computer settings as in the two individual analyses. A population of *M. enterolobii* was used as an outgroup. The correlation among genetic and geographic distance matrices were estimated with Mantel test with 10,000 permutations using IBDWS program (Jensen et al. 2005).

### *Gossypium* genotypes

*G. hirsutum* and *G. barbadense* accessions used in this study (Table 2) were obtained from Cirad's or Embrapa's germplasm collections. These genotypes have been previously tested and were shown to be

**Table 2** Description of *Gossypium* spp. accessions used in the study

Accession name	Species	Origin—accession number
CIR1348	<i>G. barbadense</i> race barbadense	Peru—wild accession; Cirad accession n° CIR1348
Clewe wilt-6	<i>G. hirsutum</i>	USA—Obsolete cultivar with moderate resistance to RKN
Fibermax966 (FM966) <sup>a</sup>	<i>G. hirsutum</i>	Australia—Commercial variety
LA-887	<i>G. hirsutum</i>	USA—Obsolete cultivar with resistance to RKN
M-315 RNR	<i>G. hirsutum</i>	USA—Breeding line highly resistant to RKN
TX-25	<i>G. hirsutum</i> race punctatum	Mexico—wild accession; NPGS PI n° 154035
CIR1343	<i>G. barbadense</i> race barbadense	Peru—wild accession; Cirad accession n° CIR1343
Wild Mexican Jack Jones (WMJJ)	<i>G. hirsutum</i>	Mexico—wild accession; USDA accession TX-2516, NPGS PI n° 593649

<sup>a</sup> Susceptible to *Meloidogyne incognita*

moderately to highly resistant to a local population of *M. incognita* race 3 (Mota et al. 2013). *G. hirsutum* cv. FiberMax966 (FM966) was used as a susceptible check, while *G. hirsutum* breeding line M-315 RNR was used as a resistant control.

#### Nematode inoculum

Four populations of *M. incognita* race 3 and one population of race 4 collected in different States of Brazil (Table 1) were used in this study. Prior to inoculation, the populations were multiplied on tomato (*Solanum lycopersicum* L., cv. Santa Clara) for 3 months under greenhouse conditions. Eggs were extracted from infected roots using 0.5 % NaOCl according to Boneti and Ferraz (1981). Counting was done using a light microscope and Peter's slides.

#### Evaluation of nematode resistance

Eight plants of each genotype were grown in pots (20 × 15 cm, h × w) filled with a mixture (1:1) of autoclaved soil and Bioplant<sup>®</sup> compost and maintained at 25–30 °C under greenhouse. Thirty days after seedling emergence, pots were inoculated with 10,000 eggs of *M. incognita* by pipetting nematode suspension around the stem base. Plants were arranged in a randomized block design with eight replications, and were watered and fertilized as needed. Four months after inoculation, the root systems were rinsed under tap water and weighed. Roots were stained with Phloxine B and evaluated for gall and egg mass numbers (galling index—GI or egg-mass index—EMI), using a 0–5 scale where 0: no galls or egg masses;

1: 1–2 galls or egg masses; 2: 3–10 galls or egg masses; 3: 11–30 galls or egg masses; 4: 31–100 galls or egg masses; and 5: >100 galls or egg masses per root system (Hartman and Sasser 1985).

Eggs were extracted using a modified extraction method according to Boneti and Ferraz (1981), using 1 % NaOCl. The reproduction factor (RF) was calculated as  $RF = FP/IP$ , where FP = final nematode population and IP = initial nematode population (IP = 10,000). The average RF was transformed as  $\log(x+1)$ , submitted to analysis of variance and the means separated using Scott-Knot's test ( $P < 0.05$ ). Accessions were classified as susceptible (S), moderately resistant (MR), or resistant (R) according to the analysis of variance, and to concepts by Oostenbrink (1966) and Starr and Mercer (2009). The experiment was repeated once with datasets analyzed as individual runs.

## Results

### Characterization of nematode populations

Two phenotypes for EST activity were recognised among the five *M. incognita* populations from cotton (Table 1). The phenotype I1 with one band (Rm: 1.0) was detected in the population from Londrina while the phenotype I2 with two bands, a major band (Rm 1.1) and a minor band (Rm 1.2), was detected in the other four populations. No correlation was observed between EST phenotype and races. The MDH N1 phenotype (Rm 1.0) was detected in all populations studied.

The five *M. incognita* populations reproduced on tomato ‘Rutgers’, watermelon ‘Charleston Gray’, pepper ‘California Wonder’ and on cotton ‘Deltapine 61’, however they varied in their response to resistant tobacco ‘NC95’; population 1 reproduced on tobacco and was classified as belonging to race 4, while populations 2, 3, 4 and 5 did not, and were assigned to race 3.

Genetic diversity

All three types of markers produced amplification products. Examples for RAPD and AFLP are shown in Fig. 1. There were a total of 331 amplified fragments for *M. incognita* populations. The number of fragments ranged from 1–11/population and varied in size from ca. 200 to 2,500 bp for RAPDs; 1–10/population and 150 to 2,500 bp for ISSRs and 1–16/population and 180 to 2,500 bp for AFLPs. Overall, only nine fragments (2.7 %) were polymorphic in this study. None of the nine ISSR primers tested produced polymorphic bands. The primers which revealed polymorphic fragments

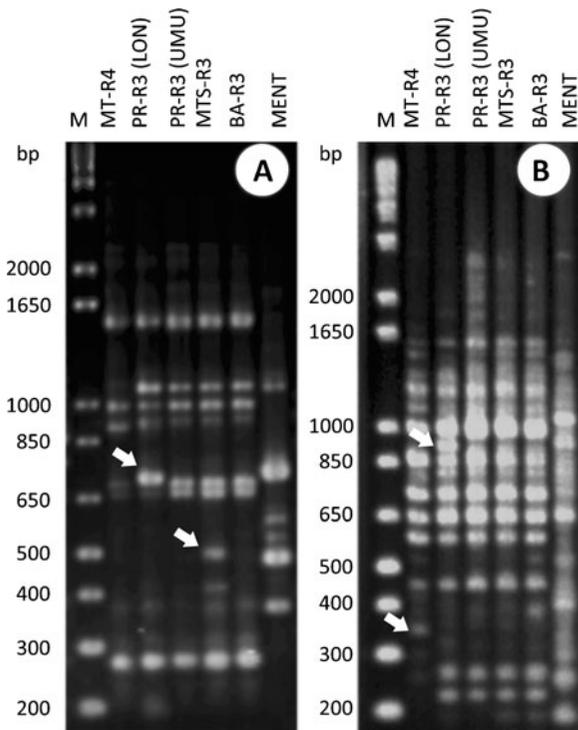
were the RAPD primers A18, D05, D13, D20, G05, and AFLP primers, AFLP 8 and AFLP 9.

All scorable amplified bands were recorded to build a 0–1 matrix, on which cluster analysis were done using UPGMA. The dendrogram resulting from the concatenation of RAPD and AFLP data set is shown in Fig. 2. The two populations (race 3) from Paraná state were closely related (91 % bootstrap support), however, no overall clustering of populations according to races was detected.

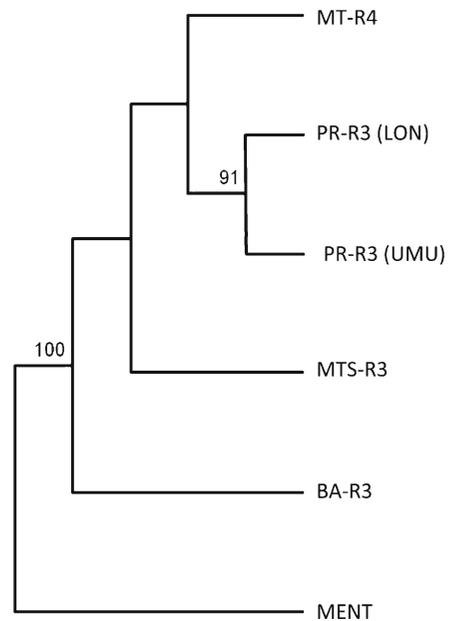
Diversity among different populations of *M. incognita* from cotton was low. A small yet significant correlation between geographic and genetic distances was observed using the Mantel test. The correlation was positive,  $R=0.64$  ( $p<0.05$ ), meaning that populations geographically closer tend also to be genetically closely related, while populations geographically distant tended to be more genetically divergent.

Resistance of cotton accessions to *M. incognita* races 3 and 4

Resistance was evaluated based on three criteria: galling index, egg mass index and reproduction factor (RF). All nematode populations tested showed reduced reproduction factors ( $RF<0.2$ ) on the resistant accessions M-315



**Fig. 1** Example of amplification patterns for *Meloidogyne* spp. populations generated with primers RAPD G05 (a) and AFLP 08 (GAC TGC GTA CCA ATT CAG T CCT) (b). Arrows indicate polymorphic bands. M, 1 kb DNA Plus ladder (Invitrogen). bp-base pairs. Isolate codes are described in Table 1



**Fig. 2** Dendrogram showing the relationships of *Meloidogyne* spp. populations using a concatenated dataset of RAPD and AFLP. Bootstrap values (>50 %) based on 1,000 replicates. Isolate codes are described at Table 1

RNR (resistant control), TX-25, CIR1348, CIR1343 and Wild Mexican Jack Jones (Table 3). Gall and egg mass formation were also partially suppressed on these cotton accessions (Table 4). In contrast, the susceptible control FM966 exhibited high gall and egg mass numbers, and high reproduction factors for all populations (Tables 3 and 4). The accessions Clevevilt-6 and LA-887, considered to display moderate resistance, showed intermediate RF (1.1 to 5.1) and gall/egg mass indices when challenged with populations MTS-R3, BA-R3 and PR-R3 LON (Tables 3 and 4). In contrast, they allowed high RF (19.4 to 57.6) and gall/egg mass formation when challenged with populations MT-R4 and PR-R3 UMU (Tables 3 and 4), and were considered susceptible to them.

## Discussion

Despite the existence of two races (races 3 and 4) and two esterase profiles (I1 and I2), a low genetic variability was observed among Brazilian populations of *M. incognita* in cotton. Similar results were reported for other *Meloidogyne* species (Castagnone-Sereno et al. 1994; Blok et al. 1997; Randig et al. 2002; Carneiro et al. 2004; Cofcewicz et al. 2005; Santos et al. 2012), and might be related to the mitotic

parthenogenetic reproduction of these species (Triantaphyllou 1985). The identification of races in RKN nematodes is important not only for the characterization of resistance, but also in the management programs in infested areas (Fassuliotis 1985; Ibrahim and Lewis 1993; Castro et al. 2003). However, although race determination is important in practice, Moens et al. (2009) recommended discontinuation of this terminology, as this concept has never been universally accepted because it measures a very restricted portion of the potential variation in parasitic variability. In our study, no relationship was observed among (host) race, enzymatic phenotypes (I1 and I2) and genetic polymorphism. These findings suggest that for *M. incognita*, races do not have a genetic determinism, which is in good agreement with previous observations (Carneiro and Cofcewicz 2008). Indeed, despite continuous efforts from several research groups, no correlation could be found between isoenzymatic or molecular infraspecific polymorphism and races in *Meloidogyne* species (Cenis 1993; Baum et al. 1994). Furthermore, we did not observe any correlation between race, enzymatic phenotype, genetic diversity and aggressiveness/virulence. The results obtained in this work could indicate a possible geographical and genetic relationship among populations of *M. incognita* from cotton. Similar results were observed for *M. arenaria* in different crops

**Table 3** Reproduction factor (RF) of five different populations of *Meloidogyne incognita* races 3 and 4 on selected cotton accessions

Cotton accessions <sup>a</sup>	Populations <sup>c</sup> /Reaction <sup>b,d</sup>				
	MT- R4	MTS-R3	BA-R3	PR-R3 (UMU)	PR-R3 (LON)
TX-25	0.10 b R	0.03 d R	0.01 c R	0.04 d R	0.13 c R
CIR 1348	0.09 b R	0.05 d R	0.25 c R	0.06 d R	0.02 c R
CIR1343	0.19 b R	0.07 d R	0.25 c R	0.17 d R	0.20 c R
Wild Mexican Jack Jones	0.04 b R	0.10 d R	0.24 c R	0.60 d R	0.01 c R
Clevevilt-6	57.61 a S	4.61 b MR	5.10 b MR	38.04 b S	3.51 b MR
LA-887	46.75 a S	1.69 c MR	3.8 b MR	19.36 c S	1.10 b MR
M-315 RNR	0.07 b R	0.01 d R	0.04 c R	0.02 d R	0.04 c R
Fibermax966 (susceptible control)	56.51 a S	19.12 a S	36.71 a S	70.69 a S	26.25 a S

Coefficient of variation (%)=28

<sup>a</sup> Cotton accessions are described in Table 2

<sup>b</sup> Mean values (8 plants per accession) are transformed as  $\log(x+1)$ . Means followed by different letters within columns are significantly different ( $P<0.05$ ) according to Scott-Knot's test

<sup>c</sup> *Mincognita* populations described in Table 1

<sup>d</sup> S susceptible; MR moderately resistant; R resistant

**Table 4** Mean galling index (GI) or egg mass index (EMI) of five different populations of *Meloidogyne incognita* races 3 and 4 on selected cotton accessions

Cotton accessions <sup>a</sup>	Populations <sup>b</sup>									
	MT- R4		MTS-R3		BA-R3		PR-R3 (UMU)		PR-R3 (LON)	
	GI <sup>c</sup>	EMI <sup>c</sup>	GI	EMI	GI	EMI	GI	EMI	GI	EMI
TX-25	2.7	0	0.7	0	2.1	0	1.2	0	3.0	0.2
CIR 1348	1.8	0	0	0	1.5	0	2.3	0	0.3	0
CIR1343	2.5	1.5	1.8	0	2.5	0	1.8	0	0.2	0
Wild Mexican Jack Jones	3.2	0	1.7	0.8	1.6	0	3.3	0	0.8	0
Clewevilt-6	4.8	4.5	3.2	2.2	5.0	3.5	5.0	4.8	3.5	2.5
LA-887	5.0	5.0	3.3	1.5	2.5	2.5	4.8	4.8	2.8	2.5
M-315 RNR	1.3	0	0.5	0	0.8	0	1.2	0	0.8	0
Fibermax966 (susceptible control)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

<sup>a</sup> Cotton accessions are described in Table 2

<sup>b</sup> *M. incognita* populations described in Table 1

<sup>c</sup> Mean values (8 plants per accession) of GI or EMI. 0: no gall or egg-mass, 1: 1–2 galls or egg-masses, 2: 3–10 galls or egg-masses, 3: 11–30 galls or egg-masses, 4: 31–100 galls or egg-masses, and 5: >100 galls or egg-masses per root system (Hartman and Sasser 1985)

(Carneiro et al. 2008). However, it would be necessary to confirm this trend by analyzing a larger set of cotton nematode populations from other continents.

The physiological variation among RKN species or population can be expressed in the plant-nematode interaction on three levels: (non)-host status, aggressiveness and virulence. Aggressiveness reflects the reproductive ability, as measured by the RF of nematodes on a susceptible host, whereas virulence is the ability to reproduce on a resistant host (Hussey and Janssen 2002). In this study, considering accession FM966 as the susceptible control, the population PR-R3 (UMU) was the most aggressive, followed by MT-R4. In our assays, populations MT-R4 and PR-R3 (UMU) overcame the resistance of Clewevilt-6 and LA-887, two accessions that are usually considered as moderately resistant to *M. incognita* (McClure et al. 1974; Robinson et al. 1997). The population MT-R4 (race 4) was more aggressive than population PR-R3 (UMU) (race 3), considering the higher reproduction factors observed in the moderately resistant cultivars (Clewevilt-6 and LA-887).

None of the five populations of *M. incognita* collected in different cotton fields were able to cause severe galling, produce high numbers of egg-masses, or reproduce at high rates on the resistant cotton accessions TX-25, M-315 RNR, CIR1348, CIR1343, and Wild Mexican Jack Jones. These data suggest that the

resistance in these cotton accessions will have broad applicability and it will be effective in the main cotton-producing regions of Brazil.

Resistance based on a few genes may impose a selection pressure on nematode populations and hasten the selection of virulent isolates (Janssen et al. 1990), as has been observed in tomato with the *Mi* resistance gene (Riggs and Winstead 1959), in wild potato with the gene *Rmc2* (Janssen et al. 1998) or in coffee with the *Mex-1* gene (Muniz et al. 2009). The high level of resistance to *M. incognita* found in the cotton breeding line M-315 RNR and in other lines derived from the same Auburn 634 RNR source has not been transferred to superior varieties. This resistance is inherited as two major genes, presumably one from Clewevilt-6 and other from Wild Mexican Jack Jones (McPherson et al. 2004; Starr et al. 2010). Clewevilt-6 has one recessive resistance gene that confers moderate resistance to *M. incognita* (Kirkpatrick and Rothrock 2001), and it is also believed to be the source of resistance in LA-887 (Jones et al. 1990). The same resistance allele is present in some of the varieties cultivated in Brazil (P. Barroso, unpublished results), pointing out to the need for more efficient resistance gene combinations. All the populations tested were avirulent to M-315 RNR, which harbours a second gene in addition to that originating from Clewevilt-6. The resistance present in Wild Mexican Jack Jones has never been deployed in varieties

cultivated in Brazil. This accession interestingly shows a high level of resistance to all populations tested, even to the most virulent ones. The other accessions demonstrating high levels of resistance to all populations tested, TX-25, CIR1348 and CIR1343, also constitute interesting sources of resistance that have, to the best of our knowledge, never been deployed in cultivated varieties. In the present study, we have shown that these sources of resistance could have a large adaptability. Studies are underway to determine whether the resistant gene(s) and allele(s) in TX-25, CIR1348 and CIR1343 are different from those present in Auburn 634 RNR and in the derived germplasm. The identification and full characterization of novel sources of resistance that can be pyramided and/or rotated is an important goal towards the effective and durable management of RKN in cotton.

**Acknowledgments** This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), EMBRAPA—Recursos Genéticos e Biotecnologia and EMBRAPA—Algodão. E.H. Silva and V.S. Mattos thank CNPq for their scholarships.

## References

- Abawi, G. S., & Chen, J. (1998). Concomitant pathogen and pest interactions. In K. R. Barker, G. A. Pederson, & G. L. Windham (Eds.), *Plant and nematode interactions* (pp. 135–158). Wisconsin: American Society of Agronomy.
- Anwar, S. A., & McKenry, M. V. (2007). Variability in reproduction of *Meloidogyne incognita* on six cultivars of cotton. *Journal of Nematology*, *39*, 105–110.
- Baum, T. J., Gresshoff, P. M., Lewis, S. A., & Dean, R. A. (1994). Characterization and phylogenetic analysis of 4 root-knot nematode species using DNA amplification fingerprinting and automated polyacrylamide-gel electrophoresis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *7*, 39–47.
- Blok, V. C., Phillips, M. S., McNicol, J. W., & Fargette, M. (1997). Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs. *Fundamental and Applied Nematology*, *20*, 127–133.
- Boneti, J. I. S., & Ferraz, S. (1981). Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne incognita* de raízes de cafeeiros. *Fitopatologia Brasileira*, *6*, 553.
- Carneiro, R. M. D. G., & Almeida, M. R. A. (2001). Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécie. *Nematologia Brasileira*, *25*, 35–44.
- Carneiro, R. M. D. G., & Cofcewicz, E. T. (2008). The taxonomy of *Meloidogyne* spp. from coffee. In R. M. Souza (Ed.), *Plant parasitic nematodes of coffee* (pp. 87–122). New York: APS Press & Springer.
- Carneiro, R. M. D. G., Tigano, M. S., Randig, O., Almeida, M. R. A., & Sarah, J. L. (2004). Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology*, *6*, 287–298.
- Carneiro, R. M. D. G., Dos Santos, M. F. A., Almeida, M. R. A., Mota, F. C., Gomes, A. C. M. M., & Tigano, M. S. (2008). Diversity of *Meloidogyne arenaria* using morphological, cytological and molecular approaches. *Nematology*, *10*, 819–834.
- Castagnone-Sereno, P. (2002). Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes? *Euphytica*, *124*, 193–199.
- Castagnone-Sereno, P., Pottie, C., Abad, P., Bongiovanni, M., & Dalmasso, A. (1991). Isolation of a repeated DNA probe showing polymorphism among populations. *Journal of Nematology*, *23*, 316–320.
- Castagnone-Sereno, P., Pottie, C., Uijthof, J., Abad, P., Wajnberg, E., Wanlerberghe-Massutti, F., et al. (1993). Phylogenetics relationships between amphimitic and partenogenetic nematodes of the genus *Meloidogyne* as inferred from repetitive DNA analysis. *Heredity*, *70*, 195–204.
- Castagnone-Sereno, P., Wanlerberghe-Massutti, F., & Leroy, F. (1994). Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. *Genome*, *37*, 904–909.
- Castagnone-Sereno, P., Bongiovanni, M., & Wajnberg, E. (2007). Selection and parasite evolution: a reproductive fitness cost associated with virulence in the parthenogenetic nematode *Meloidogyne incognita*. *Evolutionary Ecology*, *21*, 259–270.
- Castro, J. M. C., Lima, R. D. D., & Carneiro, R. M. D. G. (2003). Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de regiões brasileiras produtoras de soja. *Nematologia Brasileira*, *27*, 1–12.
- Cenis, J. L. (1993). Identification of four major *Meloidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology*, *83*, 76–80.
- Cofcewicz, E. T., Carneiro, R. M. D. G., Randig, O., Chabrier, C., & Quénéhervé, P. (2005). Diversity of *Meloidogyne* spp. on *Musa* in Martinique, Guadeloupe and French Guiana. *Journal of Nematology*, *37*, 313–322.
- Currant, J., McClure, M. A., & Webster, J. M. (1986). Genotypic differentiation of *Meloidogyne* populations by detection of restriction fragment length difference in total DNA. *Journal of Nematology*, *18*, 83–86.
- Davis, R. F., & Kemerait, R. C. (2009). The multi-year effects of repeatedly growing cotton with moderate resistance to *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, *41*, 140–145.
- Elliott, C. L., Lewis, S. A., & Mueller, J. D. (1998). Galling of South Carolina *Meloidogyne incognita* populations on resistant cotton genotypes. In *Proceedings of the 1998 Beltwide Cotton Conference* (p.145). Memphis: National Cotton Council of America.
- Fargette, M., Lollier, V., Phillips, M., Blok, V., & Frutos, R. (2005). AFLP analysis of the genetic diversity of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, major agricultural pests. *Comptes Rendus Biologies*, *328*, 455–462.
- Fassuliotis, G. (1985). The role of the nematologists in the development of resistant cultivars. In J. N. Sasser & C. C. Carter

- (Eds.), *An advanced treatise on Meloidogyne* (Vol. 1, pp. 233–240). Raleigh: North Carolina State University Graphics.
- Hartman, K. M., & Sasser, J. N. (1985). Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In C. C. Carter & J. N. Sasser (Eds.), *An advanced treatise on Meloidogyne* (Vol. 2, pp. 69–77). Raleigh: North Carolina State University Graphics.
- Huelsenbeck, J. P., Bull, J. J., & Cunningham, C. W. (1996). Combining data in phylogenetic analysis. *Trends in Ecology and Evolution*, *11*, 152–158.
- Hussey, R. S., & Janssen, G. J. W. (2002). Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In J. L. Starr, R. Cook, & J. Bridge (Eds.), *Plant resistance to parasitic nematodes* (pp. 43–70). Wallingford: CABI International.
- Ibrahim, I. K. A., & Lewis, S. A. (1993). Pathogenicity and reproduction of *Meloidogyne arenaria* race 1 and 2 and *M. incognita* race 3 on soybean. *Journal of Nematology*, *23*, 159–166.
- Janssen, R., Barker, J., & Gommers, F. J. (1990). Selection of virulent and avirulent lines of *Globodera rostochiensis* for the H1 resistance gene in *Solanum tuberosum* spp. andigena CPC 1673. *Revue de Nematologie*, *13*, 265.
- Janssen, G. J. W., Scholten, O. E., Van Norel, A., & Hoogendoorn, J. (1998). Selection of virulence in *Meloidogyne chitwoodi* to resistance in the wild potato *Solanum fendleri*. *European Journal of Plant Pathology*, *104*, 645–651.
- Jeffers, D. P., & Roberts, P. A. (1993). Effect of planting date and host genotype on the root-knot nematode-*Fusarium* wilt disease complex of cotton. *Phytopathology*, *83*, 645–654.
- Jensen, J. L., Bohonak, A. J., & Kelley, S. T. (2005). Isolation by distance, web service. *BMC Genetics*, *6*, 13. v.3.23 <http://ibdws.sdsu.edu/>.
- Jones, J. E., Dickson, J. L., Aguillar, W., Caldwell, W. D., More, S. H., Hutchinson, R. I., et al. (1990). Stoneville LA 887: a new cotton variety. *Louisiana Agriculture*, *33*, 5.
- Kirkpatrick, T. L., & Rothrock, C. S. (2001). *Compendium of cotton diseases*. Minnesota: APS press.
- McClure, M. A., Ellis, K. C., & Nigh, E. L. (1974). Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne incognita* in resistant cotton. *Journal of Nematology*, *1*, 21–26.
- McPherson, M. G., Jenkins, J. N., Watson, C. E., & Jr, M. C. (2004). Inheritance of root-knot nematode resistance in M-315 RNR and M-78 RNR cotton. *Journal of Cotton Science*, *8*, 154–161.
- Moens, M., Perry, R. N., & Starr, J. L. (2009). *Meloidogyne* species—a diverse group of novel and important plant parasites. In R. N. Perry, M. Moens, & J. L. Starr (Eds.), *Root-knot nematodes* (pp. 1–17). Wallingford: CABI International.
- Mota, F. C., Alves, G. C. S., Giband, M., Gomes, A. C. M. M., Sousa, F. R., Mattos, V. S., et al. (2013). New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defense mechanisms. *Plant Pathology*, *62*, 1173–1183.
- Muniz, M. F. S., Campos, V. P., Castagnone-Sereno, P., Castro, J. M. C., Almeida, M. R. A., & Carneiro, R. M. D. G. (2008). Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. *Nematology*, *10*, 897–910.
- Muniz, M. F. S., Campos, V. P., Moita, A. W., Gonçalves, W., Almeida, M. R. A., Sousa, F. R., et al. (2009). Reaction of coffee genotypes to different populations of *Meloidogyne* spp.: detection of a naturally virulent *M. exigua* population. *Tropical Plant Pathology*, *34*, 370–378.
- Netscher, C. (1977). Observation and preliminary studies on the occurrence of resistance—breaking biotypes of *Meloidogyne* spp. on tomato. *Cahier ORSTOM Series Biologie*, *11*, 173–178.
- Ogallal, J. L., Goodell, P. B., Eckert, J., & Roberts, P. A. (1997). Evaluation of NemX, a new cultivar of cotton with high resistance to *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, *29*, 531–537.
- Oostenbrink, M. (1966). Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen*, *66*, 4.
- Randig, O., Bongiovanni, M., Carneiro, R. M. D. G., & Castagnone-Sereno, P. (2002). Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome*, *45*, 862–870.
- Riggs, R. D., & Winstead, N. N. (1959). Studies on resistance in tomato to root-knot nematodes and on the occurrence of pathogenic biotypes. *Phytopathology*, *49*, 716–724.
- Roberts, P. A. (1992). Current status of the availability, development, and use of host plant resistance to nematodes. *Journal of Nematology*, *24*, 213–227.
- Roberts, P. A. (1995). Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. *Annual Review of Phytopathology*, *33*, 199–221.
- Roberts, P. A., & Thomason, I. J. (1989). A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. In G. E. Russell (Ed.), *Genetical and biochemical aspects of invertebrate crop pests* (pp. 269–296). Hampshire: Intercept Andover.
- Roberts, P. A., Frate, C. A., Mathews, W. C., & Osterli, P. P. (1995). Interaction of virulent *Meloidogyne incognita* and *Fusarium* wilt on resistant cowpea genotypes. *Phytopathology*, *85*, 1288–1295.
- Robinson, M. R., Jenkins, J. N., & McCarty Jr, J. C. (1997). Different sources of root-knot nematode resistance. In *Proceeding of Beltwide Cotton Research Conferences*. Memphis: National Cotton Council.
- Robinson, A. F., Bowman, D. T., Cook, C. G., Jenkins, J. N., Jones, J. E., May, L. O., et al. (2001). Nematode resistance. In T. L. Kirkpatrick & C. S. Rothrock (Eds.), *Compendium of cotton diseases* (pp. 68–72). Saint Paul: APS Press.
- Ruano, O., Carneiro, R. G., Brito, J. A., Silva, J. F., & Juliatti, F. C. (1997). Algodão (*Gossypium hirsutum*)—Doenças causadas por nematoides. In F. X. R. Vale & L. Zambolim (Eds.), *Controle de doenças de plantas- grandes culturas* (pp. 583–603). Viçosa: Editora UFV.
- Santos, M. F. A., Furlanetto, C., Almeida, M. R. A., Carneiro, M. D. G., Mota, F. C., Mendes, A. C. M., et al. (2012). Biometrical, biological, biochemical and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species. *European Journal of Plant Pathology*, *134*, 671–684.
- Semblat, J. P., Wajnberg, E., Dalmasso, A., Abad, P., & Castagnone-Sereno, P. (1998). High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. *Molecular Ecology*, *7*, 119–125.
- Starr, J. L., & Mercer, C. F. (2009). Development of resistant varieties. In R. N. Perry, M. Moens, & J. L. Starr (Eds.),

- Root-knot nematodes* (pp. 326–337). Wallingford: CABI International.
- Starr, J. L., Carneiro, R. G., & Ruano, O. (2005). Nematodes parasites of cotton and other tropical fiber crops. In M. Luc, R. A. Sikora, & J. Bridge (Eds.), *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (pp. 733–750). Wallingford: CABI International.
- Starr, J. L., Moresco, E. R., Smith, C. W., Nichols, R. L., Roberts, P. A., & Chee, P. (2010). Inheritance of resistance to *Meloidogyne incognita* in primitive cotton accessions from Mexico. *Journal of Nematology*, *42*, 352–358.
- Suazo, A., & Hall, H. G. (1999). Modification of the AFLP protocol applied to honey bee (*Apis mellifera* L.) DNA. *BioTechniques*, *26*, 704–709.
- Swofford, D. L. (2002). *PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods)*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Triantaphyllou, A. C. (1985). Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. In C. C. Carter & J. N. Sasser (Eds.), *An advanced treatise on Meloidogyne, vol. 1, biology and control* (pp. 113–126). Raleigh: North Carolina State University Graphics.
- Veech, J. A., & Starr, J. L. (1986). Comparison of development reproduction and aggressiveness of *Meloidogyne incognita* race 3 and 4 on cotton. *Journal of Nematology*, *18*, 413–415.
- Zhou, E., Wheeler, T. A., & Starr, J. L. (2000). Root galling and reproduction of *Meloidogyne incognita* isolates from Texas on resistant cotton genotypes. *Journal of Nematology*, *32*, 513–518.