



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

**ANÁLISE DE FONTES DE RESISTÊNCIA DO ALGODOEIRO A
Meloidogyne incognita RAÇA 3 E CARACTERIZAÇÃO
HISTOPATOLÓGICA DA INTERAÇÃO PLANTA-NEMATOIDE**

FABIANE DE CASTRO MOTA

**BRASÍLIA
2010**

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

Análise de fontes de resistência do algodoeiro a *Meloidogyne incognita* raça 3 e caracterização histopatológica da interação planta-nematoide.

Fabiane de Castro Mota

Orientador: Dr. José Ricardo Peixoto

Co-orientadora: Dra. Regina M.D.G Carneiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Fitopatologia.

BRASÍLIA
2010

Dissertação de Mestrado realizada junto ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor José Ricardo Peixoto e Co-orientação da Dra. Regina M.D.G. Carneiro. Apoio institucional da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Banca examinadora:

Dr. José Ricardo Peixoto, Universidade de Brasília-UnB (Orientador)
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária- FAV
Brasília, DF

Dr. Cleber Furlaneto, Universidade de Brasília- UnB (Examinador interno)
Instituto de Ciências Biológicas/ Departamento de Fitopatologia
Brasília, DF

Dr. Ricardo M. Souza, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-
UENF (Examinador externo) CCTA/LEF Campos dos Goytacazes- RJ

Dou graças ao Senhor por mais essa vitória! Com carinho a dedico à minha família e ao meu amado Cleyton. Eu não teria conseguido sem vocês ao meu lado!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus por ter me dado a graça de realizar este sonho, por ter me dado força pra seguir neste caminho, paciência pra chegar até o fim e perseverança pra não desistir diante das inúmeras dificuldades.

Aos meus orientadores, professor José Ricardo Peixoto e Dra. Regina Carneiro, o meu agradecimento, por me proporcionar condições de obter o título de mestre. Ao professor José Ricardo Peixoto, agradeço por ter me recebido de braços abertos, pelo incentivo, pelas palavras de apoio e por ter aceitado trabalhar em conjunto com a Embrapa Cenargen. À minha querida orientadora Dra. Regina Carneiro, agradeço por ter me proporcionado tantas oportunidades no universo da pesquisa, pela dedicação total, pela paciência, pelos valiosos ensinamentos, amizade, conselhos, enfim, por tudo que ela fez por mim do começo ao fim deste trabalho.

Ao Dr. Marc Giband (CIRAD, França) agradeço por disponibilizar as sementes dos acessos testados, além da valiosa contribuição no aprimoramento deste trabalho. Ao Dr. Michel Nicole (IRD, França) agradeço também pela contribuição na análise e interpretação dos resultados de histopatologia.

À minha mãe, Maria do Carmo e minha irmã Fernanda, por me incentivar e acreditar no meu potencial, por ter tido paciência nos meus momentos de nervosismo e estresse, pelas palavras de conforto nos meus momentos de desespero. Ao meu pai, José Evaristo, que mesmo não estando mais entre nós, sempre foi o motivo pelo qual eu dedico as minhas vitórias e

busco força para ser uma pessoa melhor e crescer cada dia mais para que ele sempre tenha orgulho de mim.

À família Kawaguti, especialmente ao meu amado e futuro esposo, Cleyton, por estar sempre ao meu lado, pelo incentivo desde o começo desta caminhada, pelo apoio, pela força, por toda a ajuda durante as matérias, pelas noites em claro me ajudando nos trabalhos, pela paciência, por compreender a minha ausência, por sempre ter acreditado que eu seria capaz. Enfim, pelo porto seguro que sempre encontrei nele.

Aos amigos que fiz durante o mestrado: Roberta, Niday, Dina, Edvânio, Pablo, Thiago, Daniel, Ednalva, Maria, Priscila, Fernanda, Kamila, Leila e Celso, agradeço pelo apoio e pela ajuda durante o tempo que estivemos juntos.

À Roberta, minha querida amiga de todas as horas, de todos os momentos, agradeço pela companhia sempre, por tantos conselhos, pela amizade eterna que construímos durante o mestrado. À minha amiga Niday, agradeço pela amizade, pela ajuda e pelos momentos de diversão que tivemos juntas. Aos queridos amigos, Dona Linda, seu Edson e Dona Carmosa, pelas orações e pelos pensamentos positivos.

Aos meus amigos do laboratório de Nematologia: Vanessa, Joelma, Marcilene, Mariana, Edriana, Andréia, Fábio, Danilo, Irene e Samara, os quais compartilhei as minhas angústias e alegrias, agradeço por tudo! Em especial agradeço à Vanessinha (minha grande companheira, meu anjo da guarda) e Fábio por toda ajuda durante o meu trabalho.

Ao meu anjinho da guarda, minha amiga, minha conselheira, Ana Cristina. Eu nem tenho palavras para lhe agradecer pela grande ajuda nos

trabalhos de microscopia, pelas horas e pelo carinho dedicados ao meu trabalho. Vou sentir falta de tudo Aninha! Inclusive do chazinho que você fazia pra mim nos intervalos entre um ponto e outro!

Às minhas amigas Ana, Natália e Joseane pela amizade, pelo carinho, pelos pensamentos positivos, pelas orações. Eu sei que vocês ficaram felizes por mais uma vitória na minha vida. Em especial, obrigada minha querida amiga Ana que sempre se fez presente na minha vida.

À minha amiga Fatinha, que sempre foi um anjo na minha vida, sempre com uma palavra de carinho e conforto.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília pela oportunidade. Aos professores, pelos valiosos ensinamentos e dedicação, aos funcionários do laboratório de Fitopatologia por todo suporte que proporcionaram a nós alunos e ao Ribamar , pela ajuda e instruções nas questões burocráticas.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado que me proporcionou os recursos financeiros necessários durante o curso.

Enfim, a cada um de vocês e àqueles que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para que eu pudesse realizar esse sonho e crescer como pessoa e profissional, meu muito OBRIGADA!

ÍNDICE

RESUMO	5
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 A cultura do algodão	14
3.2 A produção mundial de algodão.....	17
3.3 Nematoides parasitas do algodoeiro	18
3.4 Classificação do gênero <i>Meloidogyne</i>	19
3.5 Ciclo de vida e comportamento.....	19
3.6 Reação hospedeiro-parasita	23
3.7 Nematóide das galhas: virulência e patogenicidade	25
3.8 Resistência.....	27
3.9 Cultivares de algodoeiros resistentes ao nematóide das galhas.....	28
3.10 Mecanismos de resistência	32
4 METODOLOGIA.....	37
4.1 Acessos de <i>Gossypium</i> spp.	37
4.2 Identificação da espécie e produção do inóculo do nematóide	37
4.3 Avaliação dos genótipos quanto à reprodução do nematóide em casa de vegetação	41
4.4 Histopatologia comparada entre genótipos resistente e suscetível.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Resistência de genótipos de <i>Gossypium</i> spp. a <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3.....	45

5.2	Histopatologia comparada em plantas resistentes e suscetíveis a <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3	49
5.2.1	A interação compatível	49
5.2.2	A interação incompatível	52
6	CONCLUSÃO.....	58
7	PERSPECTIVAS PARA ESTUDOS FUTUROS.....	59
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
	ANEXOS.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do ciclo de vida do nematoide das galhas do gênero <i>Meloidogyne</i> spp.	23
Figura 2: Diagrama da origem da resistência de cultivares e linhagens de algodão a <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3.....	35
Figura 3: Sintomas das raízes de <i>Gossypium</i> spp. infestadas com <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3.....	47
Figura 4: Estudo histopatológico de raízes de <i>Gossypium hirsutum</i> (acesso FM966), suscetíveis a <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3.....	51
Figura 5: Estudo histopatológico de raízes de <i>Gossypium barbadense</i> (acesso Algodão del Pais nº 3) resistentes a <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3.....	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos genótipos/aceessos de *Gossypium* spp. avaliados nos experimentos de seleção de resistência ou susceptibilidade a *Meloidogyne incognita* raça 3.....38-41

Tabela 2: Determinação de raças para *Meloidogyne incognita* com plantas hospedeiras diferenciadoras.....41

Tabela 3: Reações de diferentes genótipos/aceessos de *Gossypium* spp. ao nematoide de galhas *Meloidogyne incognita* raça 3.....48-49

RESUMO

Análise de novas fontes de resistência do algodoeiro a *Meloidogyne incognita* raça 3 e caracterização histopatológica da interação planta-nematoide

Acessos de *Gossypium* spp., alguns deles selvagens, nunca testados no Brasil, foram avaliados quanto à resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3 em experimentos de casa de vegetação. As respostas foram caracterizadas pela reprodução do nematoide e medidas através do fator de reprodução (FR). O padrão resistente 'M-315' e os acessos 'Algodão del Pais nº 3', 'Auburn 56', 'F1 AS 0110 nº1 x M315', 'Fai Mui', 'Guazuncho 2', 'Semi Aspero Huanuco', 'TX-25 nº1', e 'Wild Mexican Jack Jones' foram considerados resistentes por apresentarem $FR < 1$. Os acessos 'AS0190 nº1', 'AS0190 nº2', 'Clevewilt-6', 'CNPAGO 2002-2043', 'DeltaOpal', 'F1 AS 0190 nº2 x M315', 'LA RN-1032', 'LA-887' e 'MT 123 nº3' foram considerados moderadamente resistentes ($FR = 1,10$ a $4,67$). Foram considerados suscetíveis ($FR = 5,15$ a $11,52$) os acessos 'FM 966' (padrão suscetível), 'AS 0191', 'China 13-9', 'Deltapine 61', 'F1 AS0110 nº1 x M315', 'F1 FM966 x AS0110 nº1', 'MT 121 Bulk Nº 6', e 'VH8 – 4602'. Os demais genótipos, 'AS0110 nº 1', 'AS 0188', 'AS0189', e 'AS0190 Montpellier' foram considerados altamente susceptíveis, superando o padrão suscetível ($FR = 14,05$ a $60,71$). Observações histológicas realizadas em seções do acesso susceptível 'FM966' inoculado com *M. incognita* raça 3 mostraram sítios de alimentação, contendo células gigantes com denso citoplasma a partir de 18 dias após a inoculação (DAI). Células necróticas nunca foram observadas durante todo o ciclo e aos 34-45 DAI apareceram fêmeas e

massas de ovos. Observações histológicas realizadas no acesso resistente 'Algodão del Pais nº3', mostraram que o parasitismo pode ser bloqueado após a penetração ou durante a migração do J2 e entre o sétimo e o 21º DAI. Observações em fluorescência e microscopia de campo claro mostraram que as células nas proximidades dos nematóides exibiram reação de hipersensibilidade com acúmulo de compostos fenólicos e a presença de células de aspecto necrótico que limitaram o desenvolvimento dos J2 e a formação de células gigantes. Células gigantes em menor número foram encontradas a partir dos 21 DAI com conteúdo citoplasmático completamente degenerado, ao lado de nematoides deformados.

Palavras-chaves: resistência, nematoide das galhas, histologia, *Gossypium* spp. , resposta de hipersensibilidade.

ABSTRACT

New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in cotton and histopathological characterization of the plant-nematode interaction

Accessions of *Gossypium* spp., some of them wild and never tested in Brazil were evaluated for resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in greenhouse experiments. The responses were characterized by the nematode reproduction, and measured by the reproduction factor (RF). The resistant control 'M-315', as well as the accessions 'Algodão del Pais nº 3', 'Auburn 56', 'F1 AS 0110 nº1 x M315', 'Fai Mui', 'Guazuncho 2', 'Semi Aspero Huanuco', 'TX-25 nº1', 'Wild Mexican Jack Jones' were resistant (RF <1). The accessions 'AS0190 nº1', 'AS0190 nº2', 'Clevewilt-6', 'CNPAGO 2002-2043', 'DeltaOpal', 'F1 AS 0190 nº2 x M315', 'LA RN-1032', 'LA-887' and 'MT 123 nº3' were considered moderately resistant (RF=1,10 to 4,67). Accessions that were considered susceptible (RF = 5,15 to 11,52), included 'FM 966' (susceptible control), 'AS 0191', 'China 13-9,' 'Deltapine 61', 'F1 AS0110 nº1 x M315', 'F1 FM966 x AS0110 nº1', 'MT 121 Bulk Nº 6' and 'VH8 – 4602'. The genotypes 'AS0110 nº 1', 'AS 0188', 'AS0189', and 'AS0190 Montpellier' were considered highly susceptible, exceeding the control (RF = 14.05 to 60.71). Histological observations made in root sections of the accession 'FM966' inoculated with *M. incognita* race 3 showed feeding sites, containing giant cells with dense cytoplasm at 18 days after inoculation (DAI). Necrotic cells were never observed during the entire cycle, and after 34-45 DAI females and egg masses were already observed. Histological observations made in the resistant accession 'Algodão del Pais Nº 3' showed that the parasitism can be blocked after J2 penetration or during

its migration at 7 to 21 DAI. Fluorescence and bright light microscopy showed that root cells surrounding nematodes exhibited hypersensitivity reaction, with the accumulation of phenolic compounds and necrotic cells that limited the development of nematodes and the formation of giant cells. Giant cells, with a degenerated cytoplasmic contents, were found in small numbers along with deformed nematodes starting at 21 DAI.

Keywords: resistance, root-knot nematode, histology, *Gossypium* spp., hypersensitivity response.

1. INTRODUÇÃO

O algodoeiro é uma planta da família Malvacea e pertence ao gênero *Gossypium*, o qual além de plantas cultivadas em ambientes variando de tropical a temperado, inclui numerosas espécies silvestres perenes (Kirkpatrick & Rothrock, 2001).

O algodoeiro (*Gossypium* spp.) é uma das principais plantas domesticadas pelo homem e uma das mais antigas. Em cerca de 50 espécies diplóides e tetraplóides distribuídas pelo mundo, às espécies alotetraploides de maior importância econômica (*G. hirsutum* L. e *G. barbadense* L.) têm origem no Novo Mundo (Brubaker *et al.* 1999). Nas Américas, há registros de fibras de algodão no Peru, datadas de 2500 a.C. a 1750 a.C. (Lerayer, 2007). No Brasil, na época do descobrimento, os indígenas já cultivavam o algodão e o convertiam em fios e tecidos (Seagri, 2009).

Atualmente, cerca de 81 países cultivam o algodoeiro, economicamente liderados pela China, EUA e Índia (Seagri, 2009). O Brasil é responsável por cerca de 1,5 milhões de toneladas, equivalente a aproximadamente 6% da produção mundial (Desenbahia, 2009).

Segundo Kirkpatrick & Rothrock (2001), são encontrados relatos de pelo menos 250 patógenos do algodoeiro. Desses, 90% são fungos, havendo registros de ataque de vírus, micoplasmas, bactérias e nematoides. Nematoides das galhas, das lesões radiculares e o nematoide reniforme são considerados importantes parasitas para a cultura do algodoeiro no Brasil. Entretanto, a maior frequência e importância econômica da associação algodão e nematoide é observada com *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949. *Meloidogyne*.

incognita é considerado um patógeno muito destrutivo para o algodoeiro. Os juvenis de segundo estágio (J2) penetram e se desenvolvem nas raízes, causando pequenas galhas e atrofia geral das plantas. Na parte aérea, um sintoma freqüentemente induzido pelo parasita é o nanismo e a clorose internerval “carijó” nas folhas, redução do volume do sistema radicular e, em consequência, a redução da produção e qualidade do produto (Silva *et al.*, 1997, Aquino, 2004). Além dos danos diretos, *M. incognita* pode interagir com o fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* W.C. Snyder & H.N. Hansen, 1940 e causar o complexo Fusnem. Esses patógenos, atuando em conjunto, danificam mais intensivamente a planta (Jeffers & Roberts, 1993). Tanto no Brasil como nos EUA, a raça 3 de *M. incognita* é a mais importante para a cotonicultura (Lordello *et al.*, 1984; Ruano *et al.*, 1985; Carneiro *et al.*; 1990; Starr & Smith, 1993).

Atualmente no Brasil, o manejo da meloidoginose do algodoeiro é realizado por meio de rotação de culturas e uso de variedades com níveis intermediários de resistência. O controle químico, utilizado no passado, não se aplica na realidade atual da cotonicultura brasileira, em razão da não eficiência, da saída dos nematicidas do comércio e devido aos danos ambientais causados por esses produtos (Ruano *et al.*, 1997). Segundo Abrão & Mazzafera (2001), como os nematoides têm sido um sério problema na cultura do algodoeiro e não existem variedades comerciais com elevados níveis de resistência, há grande interesse em melhorar geneticamente as cultivares, com a identificação e caracterização de novas fontes de resistência. O uso de cultivares resistentes é a maneira mais eficaz, de baixo custo e de menor dano ambiental para se controlar parasitas como *M. incognita* e proporcionar uma redução da população do nematoide no solo

(Williamson & Hussey, 1996). Algumas cultivares de algodão, moderadamente resistentes ao nematoide das galhas já foram identificadas, mas não são utilizadas em escala comercial devido ao seu baixo potencial agrônômico ou à sua área restrita de adaptação (Ogallo *et al.*, 1997). Nos Estados Unidos, três cultivares comerciais apresentam moderado nível de resistência a *M. incognita*: 'Stoneville LA887', 'Paymaster 1560' e 'Acala NemX' (Robinson & Percival, 1997). No Brasil, pesquisas recentes indicaram que o cultivar 'IAC 23' apresenta bom nível de resistência (Fuzatto & Cia, 2001). Ressalta-se, entretanto que, com exceção da cultivar Acala NemX, que apresenta nível moderado de resistência e continua sendo utilizada pelos produtores americanos de algodão, as demais são consideradas variedades obsoletas em razão das suas características agrônômicas não atenderem os padrões de produtividade e qualidade do mercado atual. No Brasil, a cultivar IAC 23, uma das poucas cultivares comerciais de algodoeiro desenvolvidas com nível de resistência moderado ao nematóide das galhas, e que foi utilizada no passado, tornou-se obsoleta com a nova realidade da cotonicultura nacional (Goldfarb *et al.*, 2003).

Embora no Brasil vários genótipos tenham sido lançados com resistência múltipla, inclusive a *M. incognita* (Almeida *et al.*, 2001; Cia *et al.*, 2001), todas elas tiveram origem genética na cultivar americana Auburn 56 (Edivaldo Cia, Instituto Agrônômico de Campinas, comunicação pessoal). Porém, essa cultivar foi considerada obsoleta nos programas de melhoramento genético realizados nos EUA por apresentar resistência apenas intermediária ao complexo Fusnem (Shepherd, 1982, 1983), e há muitos anos foi substituída por outras fontes de resistência mais efetivas (Kirkpatrick & Rothrock, 2001).

Dessa maneira, é primordial que outros acessos e cultivares sejam testados para posteriormente serem introduzidas nos programas de melhoramento do algodoeiro, visando a resistência a *M. incognita* raça 3.

Esta dissertação é parte do projeto da Embrapa Algodão (nº: 020721100-02) “Pré- melhoramento do algodoeiro com ênfase para resistência múltipla”.

2. OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivos estudar a reação de diferentes acessos de algodoeiro, quanto à resistência ou suscetibilidade a *M. incognita* raça 3, bem como analisar as alterações histológicas associadas à infecção pelo nematoide em acessos suscetível e resistente, de maneira a esclarecer os mecanismos de resistência que atuam para controlar a infecção e o avanço do parasitismo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A cultura do algodão

O algodoeiro pertence ao gênero *Gossypium* L., 1753, que além das plantas cultivadas, comporta plantas selvagens. As cerca de 50 espécies de *Gossypium* sp. são endêmicas das regiões tropicais e sub-tropicais da Austrália, África, Ásia, e América Central e do Sul (Percival *et al.*, 1999; Wendel & Alberts, 1992; Wendel *et al.* 2009). O termo “algodoeiro” refere-se a quatro espécies do gênero *Gossypium* sp. - *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, contribuindo com aproximadamente 95% do algodão produzido mundialmente. As espécies diplóides *G. arboreum* e *G. herbaceum* ainda são cultivadas em algumas áreas da Ásia (Ogrt, 2008).

G. 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). É constituído por duas entidades arbóreas: raça barbadense e raça brasiliense. Esta última compõe o algodão conhecido como “rim-de-boi” da Bacia Amazônica (Brubaker, 1999). Os cultivares elite de *G. barbadense* são representados 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, mas que inclui também as variedades americanas de algodoeiro *Acala* e o algodoeiro mocó (*G. hirsutum* raça

marie-galante) (Brubaker *et al.*, 1999). Hutchinson (1951) reconheceu sete raças de *G. hirsutum*: yucatanense, punctatum, palmeri, latifolium, marie-galante, morrilli e richmondi. Destas, punctatum, latifolium e marie-galante sofreram dispersão, sendo consideradas as raças a partir das quais derivou os modernos 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 fibra 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 e 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 sido realizada 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 entre 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. Por isso, a cultura requer manejo e sistema de produção específicos, principalmente a rotação com espécies

leguminosas e gramíneas. São desfavoráveis solos ácidos ou pobres em nutrientes, úmidos ou sujeitos à encharcamento, rasos e compactados (Buainain & Batalha, 2007).

As pragas que atacam o algodoeiro podem ser divididas em dois grupos: i) as que ocorrem principalmente no estabelecimento da cultura (broca-da-raiz, tripes, 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, notadamente 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 e uso de feromônios. O controle químico é adotado de acordo com a espécie, por meio de produtos sistêmicos ou de contato. Nesse cenário, a perspectiva da utilização de variedades transgênicas com resistência a insetos é um fator relevante a ser considerado e poderá ser, em um futuro próximo, fator de vantagem competitiva da maior ou menor competitividade de áreas específicas para o cultivo de algodão (Buainain & Batalha, 2007).

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 se

tornar 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 sadias, 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 tolerante não são utilizadas (Beltrão, 1999; CIA *et al.*, 1999).

3.2 A produção mundial de algodão

O algodão é uma cultura de extrema importância mundial, sendo cultivado em cerca de 34,4 milhões de hectares (ha) em todo o mundo. O Brasil é responsável por um milhão de hectares, o que coloca o país no quinto lugar no ranking mundial de área colhida (Lerayer, 2007).

A China é o maior produtor mundial de algodão, com mais de 7,7 milhões de toneladas, que corresponde a 30% de todo o algodão em pluma produzido no mundo, seguido pela Índia (20% da oferta global); o Estados Unidos (16% da produção mundial); o Paquistão (7% da produção global) e o Brasil, responsável por 1,5 milhões de toneladas, equivalente a aproximadamente 6% da produção mundial (Desenbahia, 2009).

Em termos de produtividade, o Brasil se destaca com o índice mais elevado entre os maiores produtores mundiais de pluma: 1.423 kg por ha na safra 2007/2008. A China, que apresenta produtividade de 1.257 kg/ha, apresenta o segundo maior índice, sendo seguida pelos Estados Unidos, com 984 kg/ha e Índia, com aproximadamente 580 kg/ha (Desenbahia, 2009).

No Brasil, 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 (IBGE, 2006).

3.3 Nematoides parasitas do algodoeiro

Dentre as espécies parasitas de raízes de algodoeiro, apenas quatro são reconhecidas por causarem danos econômicos significativos em muitas áreas de cultivo. As duas espécies mais importantes são os nematoides das galhas, especificamente *Meloidogyne incognita*, o qual é encontrado mundialmente e o nematoide reniforme, *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940, encontrado em muitas regiões tropicais e em certas áreas quentes de zonas temperadas, incluindo o sul dos Estados Unidos e leste do Texas. As outras duas espécies, *Hoplolaimus columbus* Sher, 1963 e *Belonolaimus longicaudatus* Rau, 1958, também podem ocorrer em densidades populacionais prejudiciais em áreas geográficas restritas. Esses nematoides diferem no ciclo de vida, hábito alimentar, ecologia e no mecanismo de herança de resistência no algodão (Kirkpatrick & Rothrock, 2001).

No Brasil, os principais nematoides causadores de danos à cultura do algodoeiro são *Meloidogyne incognita*, *Rotylenchulus 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, já que o mesmo infecta plantas das mais diversas famílias botânicas. Nessa espécie, apenas as raças 3 e 4 parasitam o algodoeiro, sendo a raça 3 a mais freqüentemente encontrada em áreas de produção comercial (Inomoto, 2001).

O parasitismo por nematóides em plantas de algodoeiro pode ocorrer em diferentes tipos de solo, sendo os solos mais arenosos mais propícios à disseminação e infecção por *M. incognita* (Asmus, 2004).

A presença de *M. incognita* em altas populações pode inviabilizar a cultura, com relatos de abandono de áreas infestadas nos estados de São Paulo e Goiás (Ide, 2000). Na região centro-oeste, *M. incognita* apresenta distribuição restrita, por ser uma região relativamente nova para a cultura do algodão, mas nas regiões tradicionais de cultivo de algodão este nematoide encontra-se amplamente distribuído e é responsável por sérios prejuízos (Silva & Santos, 1997).

3.4 Classificação do gênero *Meloidogyne*

As espécies do gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887 constituem uma pequena parte do Filo Nematoda, que compreende os parasitas do homem, dos animais e parasitas de plantas e espécies de vida livre no solo, em água doce e no mar (Maggenti, 1981). O gênero *Meloidogyne* sp. faz parte da classe Chromadorea, ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Infraordem Tylenchomorpha, Superfamília Tylenchoidea e família Meloidogynidae (De Ley & Blaxter, 2002; Karssen & Moens, 2006).

3.5 Ciclo de vida e comportamento

O ciclo de vida do nematoide das galhas é apresentado na Fig.1. Os ovos dos nematoides das galhas são envolvidos por uma matriz gelatinosa, que geralmente depositadas na superfície das galhas. Às vezes elas ocorrem sem que haja a presença de galhas. O desenvolvimento embrionário resulta no juvenil de primeiro estágio (J1) que sofre uma ecdise ainda no ovo, dando origem ao juvenil de

segundo estágio (J2). A eclosão dos ovos de *Meloidogyne* sp. é influenciada pela temperatura e ocorre, na maioria das espécies, sem que seja necessário o estímulo das raízes das plantas. Entretanto, os exudados radiculares às vezes estimulam essa eclosão. A membrana que envolve o ovo do nematoide torna-se flexível antes da eclosão e enzimas são envolvidas na alteração da estrutura dessa membrana. Quando os J2s eclodem da massa de ovos, eles infectam galhas vizinhas ou penetram em raízes novas. O J2s e os machos são os estádios do ciclo de *Meloidogyne* que podem ser encontrados livremente no solo. Em algumas espécies, o J2 pode sobreviver no solo no estado de quiescência por um longo período de tempo. Entretanto, durante esse período, eles consomem suas reservas alimentares acumuladas em seu intestino. Como a infectividade está relacionada ao conteúdo dessas reservas, ela poderá ser reduzida depois de longos períodos fora das raízes (Karssen & Moens, 2006).

Os J2 são atraídos pelas raízes das plantas e a localização depende da percepção dos gradientes de atrativos que emanam das raízes. O J2s infectivos acumulam-se na região de alongação celular logo atrás da coifa, mesmo nas plantas resistentes aos nematoides das galhas. Eles também são atraídos pelos meristemas apicais, pontos onde emergem as raízes laterais e locais onde penetram outros J2s. Existem poucas diferenças nos atrativos de isolados de raízes suscetíveis e resistentes, entretanto, quando ambas são presentes, as raízes suscetíveis são mais atrativas. A natureza dos estímulos produzidos pelas raízes e percebidos pelos J2s ainda não são claros. Muitos componentes orgânicos e inorgânicos excretados pelas raízes formam gradientes na superfície das raízes para dentro do solo e muitos influenciam os nematoides. Dióxido de carbono é freqüentemente considerado como

sendo o fator mais importante de atração planta-nematoide. (Karssen & Moens, 2006).

Quando os nematoides das galhas entram em contato com as raízes das plantas, eles geralmente penetram imediatamente. O J2 penetra as paredes celulares rígidas da raiz por uma combinação de danos físicos, através da perfuração com o estilete e da ação de enzimas celulíticas e pectolíticas (Karssen & Moens, 2006)

Depois da penetração das raízes os J2s migram entre as células para o córtex, na região de diferenciação celular. Essa migração causa separação das células ao longo da lamela média. As células ao longo do caminho do nematoide distendem-se, mas raramente mostram sinais de alimentação. O aumento nos níveis de enzimas oxirredutoras também pode ser encontrado, indicando o aumento da atividade metabólica. Para contornar a barreira formada pela endoderme, o J2s migram em direção a ponta da raiz, contornando-a até encontrar a região meristemática apical. Em seguida, eles percorrem o cilindro vascular até a zona de diferenciação. Posteriormente, eles tornam-se sedentários no tecido cortical na zona de diferenciação. A cabeça do J2 posiciona-se na periferia do tecido vascular e o resto do corpo na região do córtex paralelo com o eixo longitudinal da raiz (Karssen & Moens, 2006)

O J2s alimentam-se de células especiais chamadas células nutridoras (células gigantes), sofrem então, mudanças morfológicas, passando por três ecdises para se transformarem em juvenis de terceiro e quarto estádios e, finalmente, em adultos. Logo após a última ecdise, a fêmea adulta recomeça a se alimentar, permanecendo ali para o restante de sua vida. Durante esse desenvolvimento pós-

embrionário, o sistema reprodutivo desenvolve-se e crescem as gônadas funcionais. A mudança de forma nos machos (piriforme para adulto vermiforme) ocorre durante a ecdise de J4 para adulto. Nesse período, o J4 sofre uma metamorfose na qual o corpo se alonga, assumindo o macho, uma forma vermiforme (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). A duração do ciclo de vida do nematoide de galhas é bastante afetada pela temperatura. As fêmeas produzem ovos por cerca de três meses. Depois cessam a produção, podendo viver um pouco mais. Os machos vivem semanas e os J2s podem viver de poucos dias a meses (Taylor & Sasser, 1983). No caso de *M. incognita* parasitando o tomateiro, à temperatura de aproximadamente 29°C, as primeiras fêmeas adultas aparecem entre o 13º e 15º dias após a penetração; os primeiros ovos são encontrados do 19º ao 21º dias (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

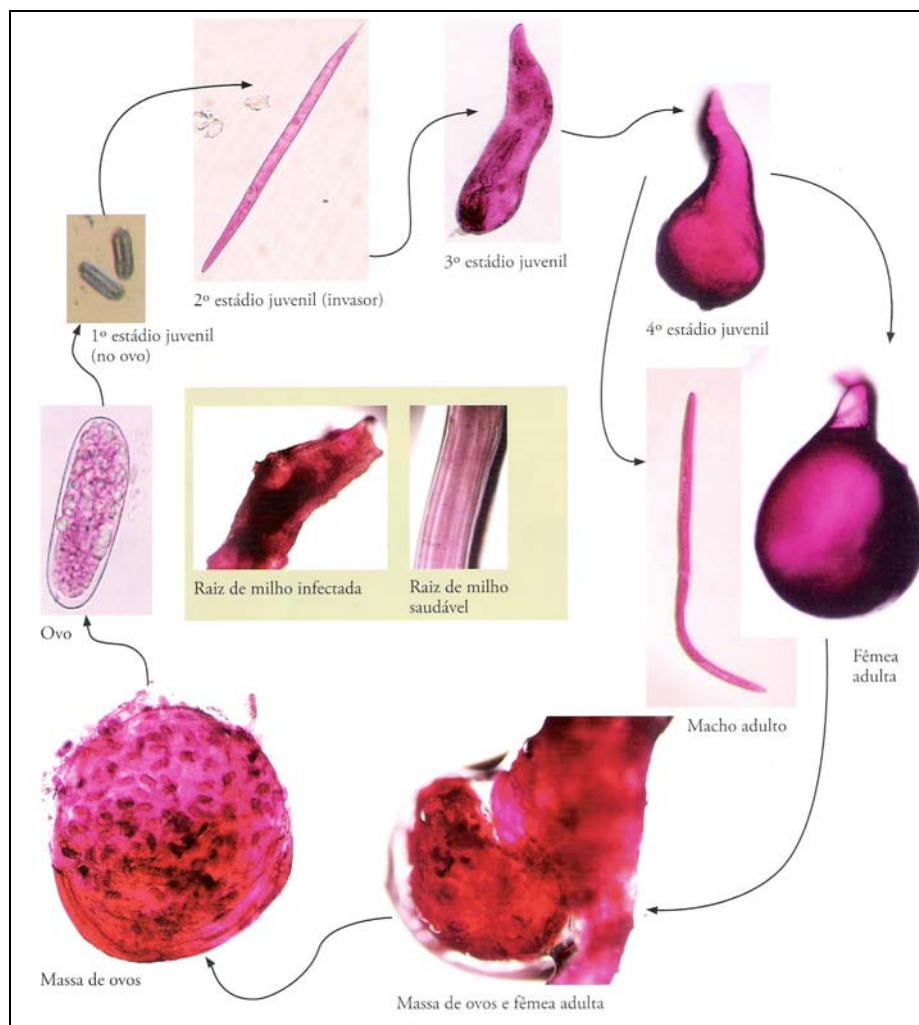


Figura 1: Ciclo de vida do nematoide das galhas gênero *Meloidogyne* (adaptado de Coyne, *et al.*, 2007).

3.6 Reação hospedeiro-parasita

Plantas suscetíveis reagem à secreções produzidas pelos J2 através de mudanças morfológicas e fisiológicas. As células gigantes (de 2 a 12, em média 6), são sítios de alimentação para o nematoide das galhas, sendo estabelecidas no floema ou no parênquima adjacente. Essas células são altamente especializadas. A indução e a manutenção dessas células tem sido alvo de várias hipóteses e sugere-se que ambas são controladas por secreções aplicadas com o estilete e originadas das glândulas sub-ventrais e dorsais do nematoide. A remoção dos solutos das

células gigantes pode ser um dos estímulos necessários para manter o metabolismo ativo dessas células. Caso o hospedeiro não responda à formação da célula gigante, os J2s não se desenvolvem e, conseqüentemente, morrem por falta de alimento. Se, por acaso, eles possuírem reservas alimentares suficientes, podem migrar para fora da raiz e penetrar em outra raiz (Karssen & Moens, 2006)

As células gigantes induzidas pelo nematoide das galhas dividem os seus núcleos sem que haja a formação de novas paredes celulares, ou seja, ocorrem repetidas endomitoses sem que ocorra citocineses. No começo da formação da célula gigante, elas são preenchidas predominantemente por vacúolos celulares, os núcleos são localizados no citoplasma periférico. Dentro da célula, a endomitose de diferentes núcleos ocorre sincronicamente. Em células gigantes mais desenvolvidas, a divisão sincronizada dos núcleos pode não ser constante. Há aumento do conteúdo citoplasmático e a célula expande-se lateralmente (Karssen & Moens, 2006).

As paredes celulares que delimitam as células gigantes são aparentemente contínuas. Entretanto, existem áreas mais finas e mais grossas ao longo de uma mesma parede celular. Com o aumento da demanda de alimentação do nematoide, provocado pelo aumento da produção de ovos, o citoplasma da célula gigante apresenta uma intensa atividade metabólica. Isso é demonstrado pela presença da aneuploidia dos núcleos, com 14 a 16 vezes mais DNA que nos núcleos das células da ponta da raiz não infectadas (Karssen & Moens, 2006).

Ao mesmo tempo, com o estabelecimento das células gigantes, os tecidos da raiz em volta do nematoide passam por hiperplasia e hipertrofia, causando as galhas nas raízes, comumente associadas à infecção de *Meloidogyne* spp. As galhas

geralmente começam a desenvolver-se um a dois dias depois da penetração do J2. O tamanho dessas galhas está relacionado ao hospedeiro, o número de J2s e a espécie do nematoide, entretanto a sua formação não é essencial para o desenvolvimento do nematoide (Karssen & Moens, 2006).

Os reguladores de crescimento das plantas tem implicação no desenvolvimento das células gigantes e das galhas. As auxinas (promotoras do crescimento das células) têm sido identificadas em maior concentração nos tecidos das raízes onde há galhas em comparação com os tecidos não infectados. O aumento de citocinas (promotoras da divisão celular) também pode ser observado nas plantas infectadas por *Meloidogyne* spp. A aplicação desses reguladores de crescimento em plantas resistentes pode reverter a resposta de resistência da planta ao patógeno, tornando-as suscetíveis. Um outro regulador de crescimento, o etileno, também está associado à formação de galhas. Este hormônio também pode estar envolvido na hipertrofia do parênquima cortical durante a formação das galhas (Karssen & Moens, 2006)

3.7 Nematoide das galhas: virulência e patogenicidade

A variação intra-específica de *Meloidogyne* spp. pode ser expressa na interação planta-nematoide em três níveis: a condição de não hospedeira, condição de agressiva e condição de virulenta. O espectro de hospedeiros que leva à diferenciação de raças já foi descritos para *M. incognita*, *M. arenaria* (Sasser, 1980) e *M. chitwoodi* (Mojtahedi *et al.*, 1988). Para outras espécies, tais como *M. hapla* e *M. javanica*, diferenças de hospedeiros foram também relatadas, mas parecem ser raras (Carneiro *et al.*, 2004). A agressividade reflete a habilidade do nematoide de se reproduzir em bons ou maus hospedeiros. A virulência é a habilidade que o

nematoide possui de se reproduzir em hospedeiros com genes resistente. Em relação à virulência, existe a interação de genes de virulência com genes de resistência que são respectivos no parasita e no hospedeiro (Hussey & Janssen, 2002).

Relatos de virulência em *Meloidogyne* spp. são exemplificados através do 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 sucessiva geração 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 nematóide, 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 piramidagem, torna-se dessa forma ainda mais importante.

3.8 Resistência

A resistência de plantas a patógenos é definida como a habilidade da planta em inibir ou impedir a reprodução do parasita (Wingard, 1953). De maneira geral, dois tipos de resistência podem ser observados: pré-infectiva e pós-infectiva. A resistência pré-infectiva é uma resistência passiva, que ocorre antes da penetração do nematoide na superfície das raízes, e está associada à produção de exudados radiculares que repelem o J2 ou são tóxicos a ele ou a não penetração devido a condições físicas adversas das raízes (Rhode, 1972, Roberts *et al.*, 1998). A resistência pós-infectiva é a mais comum e se manifesta após a penetração do J2 nos tecidos da planta. É uma resistência ativa, determinada pela interação entre parasita e hospedeiro (Roberts *et al.* 1998).

Muitas plantas são imunes ou não hospedeiras a muitos nematoides. Elas não permitem o parasitismo, ou seja, bloqueiam a penetração inicial na raiz, ou previnem o desenvolvimento e a reprodução do parasita, não ocorrendo a multiplicação do nematóide. A resistência pode ser de baixa a moderada (parcial a intermediária) ou ser alta. A parcial ou moderada, permite uma reprodução baixa do

patógeno (Roberts, 2002). A suscetibilidade é usada como o oposto à resistência. Plantas susceptíveis permitem o desenvolvimento normal do nematoide com uma alta reprodução (Roberts, 2002). A tolerância se refere à habilidade de plantas permitirem a invasão e reprodução do nematoide, mas não apresentarem sintomas ou danos significativos (Fassuliotis, 1979). A tolerância é oposta à intolerância, que é utilizada para plantas que quando infectadas crescem menos, ou morrem, ou ainda reduzem drasticamente a produtividade. Desta forma, uma planta suscetível pode ser intolerante ou tolerante ao nematoide (Roberts, 2002).

A resistência é relatada como um modo de herança que pode ser expressa por um único gene (monogênica), por alguns genes (oligogênica), ou por um número maior de genes (poligênica) (Roberts, 2002). A resistência também pode ser classificada em vertical (qualitativa, é específica a uma determinada raça ou biótipo do patógeno) e resistência horizontal (quantitativa, é efetiva contra todas as variantes do patógeno) (Vanderplank, 1978). A resistência vertical é usualmente controlada por um ou alguns genes. É uma interação do tipo gene a gene, como comumente ocorre na interação patógeno-planta. Já a resistência horizontal é usualmente poligênica recessiva com genes de menor efeito responsáveis por ela, possui sempre efeitos aditivos que conferem um nível quantitativo de resistência. Em geral, a resistência horizontal é mais durável à pressão exercida pela população de nematoides (Flor, 1971).

3.9 Cultivares de algodoeiros resistentes ao nematoide das galhas

Infelizmente, há poucos cultivares de algodoeiros resistentes ao nematoide das galhas com bom potencial de produção e boa qualidade de fibra. Nos EUA, os únicos cultivares comerciais de algodão resistentes ao nematoide das galhas

disponíveis são Acala NemX e Stoneville 5599BR (adaptados às áreas de produção na 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 agrônômicas 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). Quando Acala NemX foi plantado nas mesmas parcelas infestadas durante três anos consecutivos, o rendimento ficou estável, enquanto que o rendimento nas parcelas plantadas com cultivares suscetíveis ao nematoide declinou cerca de 30% (Ogallo *et al.*, 1999).

Além das cultivares comerciais, várias linhagens altamente resistentes foram disponibilizadas, incluindo algodoeiros Auburn 623 RNR (*G. hirsutum*), resultante do cruzamento entre Clewilt 6 e Wild Mexican Jack Jones (Shepherd, 1974), e Auburn 634 RNR, desenvolvido a partir do cruzamento Auburn 623 RNR × Auburn 56, sendo essa última utilizada para desenvolver a série 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 Clewilt 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 o qual a

fonte de origem da resistência não é clara (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 é oriunda do acesso Clewewilt 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, Clewewilt 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-se seis genótipos de algodoeiro disponibilizados pelo Instituto Agronômico 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 do 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).

Entre os genótipos testados por Almeida *et al.* (2009), a cultivar IPR 140, lançada em 2007 a partir da linhagem PR 94-227-9/18 que posteriormente se transformou na cultivar IPR 120, 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 da 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.* 2009) 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 uma maneira geral, evidencia-se que esse cultivar destacou-se frente às mesmas doenças citadas para a cultivar IPR-140.

Outro relato de resistência foi apresentado por Goldfarb *et al.* (2003), o qual avaliou 23 linhagens do programa de melhoramento da Embrapa Algodão e três cultivares quanto à reação a *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* associado a *Meloidogyne incognita* raça 3. Dessa forma, IAC-23 e as linhagens CNPA GO

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*.

3.10 Mecanismos de resistência

Os eventos celulares e bioquímicos associados à resistência do algodão e outras plantas têm sido estudados extensivamente. Na maioria dos casos, o J2 invade as raízes de plantas resistentes e migram através dos tecidos como nas plantas suscetíveis. Entretanto, nas plantas resistentes, o desenvolvimento da célula gigante especializada exigida para o desenvolvimento do nematoide é inibida e o nematoide é incapaz de completar o seu ciclo de vida. Em alguns casos, plantas resistentes exibem resposta de hipersensibilidade (RH), que resulta no colapso e morte das células próximas ao nematoide. Aldeídos terpenóides tóxicos podem acumular-se ao redor da parte anterior do nematoide mais rapidamente na planta resistente do que na suscetível (Kirkpatrick & Rothrock, 2001).

De acordo com Veech (1978,1979), a infecção por *Meloidogyne incognita* induz aldeídos terpenóides na endoderme das raízes de algodão, com a formação de aldeídos mais rápida e intensa no germoplasma resistente quando comparada com o suscetível. Esse mesmo autor demonstrou através de bioensaios que os aldeídos terpenóides foram tóxicos aos nematoides e que a mistura natural de terpenóides foi mais inibidora do que o gossipol purificado.

Na família das solanáceas, a resistência é usualmente associada à RH, na qual ocorre morte celular rápida e localizada na planta infectada em resposta à infecção pelo nematoide. Juvenis de segundo estágio aparecem envolvidos por

células necrosadas, não conseguem se desenvolver e morrem. A resposta pode ocorrer precocemente e desta forma prevenir a penetração e a migração de J2 ou tardiamente, inibindo o desenvolvimento de células gigantes, suprimindo o desenvolvimento e a multiplicação do parasita. Vários autores descrevem a RH como uma reação local, acompanhada pela produção ou liberação de formas de oxigênio reativo, ácido salicílico, compostos fenólicos ou outros compostos envolvidos no caminho da sinalização extracelular. A ativação de genes de defesa, alterações estruturais (especialmente paredes celulares reforçadas) e síntese de fitoalexinas sintéticas também podem ser freqüentemente observadas. Estes fenômenos ocorrem no local de infecção, alguns minutos depois da penetração (Pegard *et al.*, 2005).

Jenkins *et al.* (1995) comparou três níveis de resistência aos nematoides das galhas em 'M-315' (resistente), 'M-78' (moderadamente resistente) e 'M-8' (suscetível), em relação ao desenvolvimento pós-infeccional do nematoide. Os autores avaliaram também o desenvolvimento de galhas nas raízes e observaram que, embora a penetração de J2 nos três germoplasmas tenha sido similar, a maioria dos J2 que penetrou na M-315 não conseguiu desenvolver-se e atingir o estádios J3 e J4. Após a penetração na M-315, muitos J2 não conseguiram manter o desenvolvimento da célula gigante e apenas poucas, pequenas galhas foram produzidas. Estes autores observaram que o estágio crítico para o desenvolvimento do nematoide no germoplasma resistente ocorreu por volta de seis dias (transição de J3 para J4) e provavelmente, novamente aos 24 dias (transição de fêmeas jovens para fêmeas adultas com ovos). Nestes momentos, o número de nematoides diminuiu acentuadamente em M-315, podendo ser os momentos, em que os dois

genes de resistência estão ativamente expressos (McPherson, 1993). No acesso moderadamente resistente M-78, o estágio crítico ocorreu por volta de 24 dias, já que o desenvolvimento dos nematoides declinou após este tempo. De acordo com McPherson (1993), o germoplasma moderadamente resistente possui apenas um dos genes de resistência, o que também foi proposto no trabalho de Jenkins *et al.* (1995), pois a maioria dos genes que operam por volta de seis dias no acesso resistente M-315 são ausentes no acesso M-78, entretanto os genes que operam aos 24 dias podem ser os mesmos na M315 e M-78. McClure *et al.* (1974) relatou que em Clevevilt 6, o efeito dos genes de resistência podem ser medidos por volta de oito dias, o que pode explicar a diferença nas respostas entre M-315 e M-78, já que M-315 tem os mesmos genes para resistência que são expressos em Auburn 623, o qual foi desenvolvido por Shepherd (1974) através de um retrocruzamento entre Clevevilt-6 com a linhagem Wild Mexican Jack Jones. O germoplasma M-78 é uma seleção a partir de cruzamentos de acessos T-78 de *G. hirsutum*, o qual tem como origem um acesso moderadamente resistente (Jenkins *et al.* 1979) (Fig. 2).

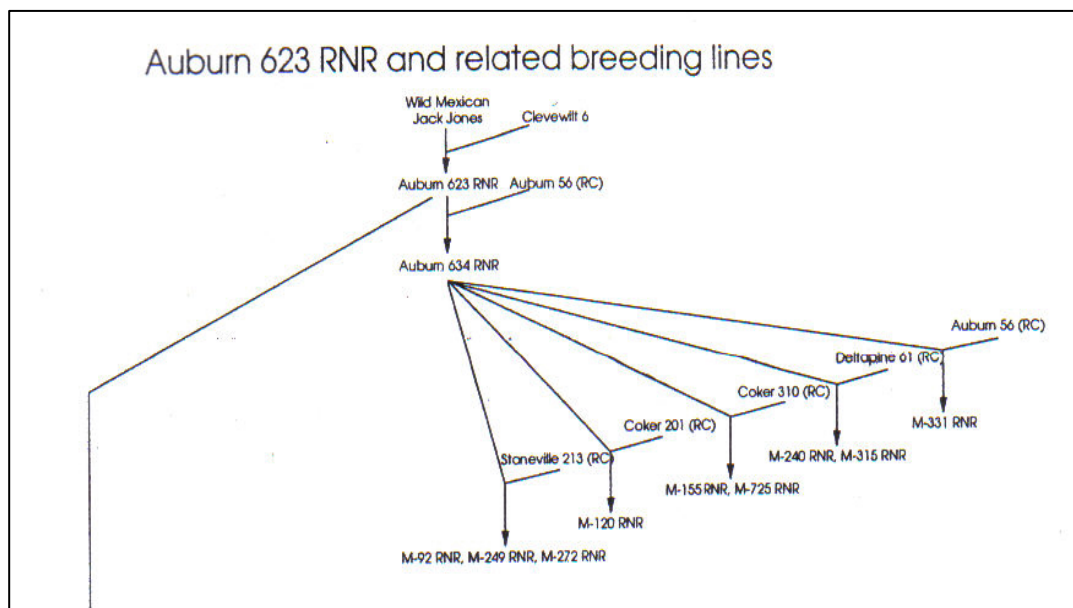


Figura 2: Representação diagramática da origem da resistência de cultivares e linhagens de algodão (Kirkpatrick & Rothrock, 2001).

Em relação aos estudos de caracterização molecular, Callahan *et al.* (1997) identificou uma proteína de 14 KDa denominada MIC3 (*Meloidogyne* Induced Cotton 3), que se acumulava dentro de galhas imaturas formadas em plantas resistentes ao nematoide das galhas, comparadas com um controle suscetível. As seqüências correspondentes de cDNA e DNA genômico dessa proteína e o gene chamado MIC3 foram identificados por Zhang *et al.* (2002), o qual confirmou o acúmulo de mRNA de MIC3 e proteínas dentro de galhas de raízes resistentes do algodoeiro.

No trabalho realizado por Wubben *et al.* (2008), foram analisados o acúmulo de transcritos dessa proteína e a caracterização fenotípica dos germoplasmas M-315 (resistente) e M8 (susceptível) aos 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação (DAI). Esses autores observaram que aos 14 dias houve penetração dos J2 em níveis equivalentes nos dois germoplasmas, nos estágios iniciais de formação de galhas,

como também um aumento significativo nos níveis de transcrição de MIC nas raízes de M-315 e M8, comparados com seus respectivos controles não infectados. Porém, a indução de MIC foi significativamente maior no germoplasma resistente em comparação com o suscetível. Aos 21 dias não foram observadas diferenças aparentes no desenvolvimento entre raízes infectadas de M-315 e M8. Estágios tardios de J2 e J3 foram observados dentro do tecido das galhas das duas linhagens e o nível de transcrição de MIC já não era significativamente elevado em M8, enquanto que em M315 houve uma indução, aproximadamente, oito vezes mais elevada. Uma clara diferença fenotípica foi citada entre os dois germoplasmas analisados aos 28 dias. Para M-315, o tamanho das galhas não demonstrou aumento em relação ao tempo anterior e as galhas apresentaram uma cor mais escura, em contraste com as galhas das raízes de M8, que continuaram a crescer em tamanho, apresentando uma cor clara. A coloração das galhas das duas linhagens com fuscina ácida revelou que os J2 desenvolveram-se até a fase de J4 em M8 e que não ocorreu nenhum progresso significativo no desenvolvimento dos nematoides em M-315. Embora isto tenha mostrado a primeira grande diferença fenotípica entre eles, o qRT-PCR revelou que os níveis de transcrição de MIC haviam sido diminuído em raízes de M-315 a um nível igual ao de M8. Aos 35 dias o autor observou fêmeas completamente desenvolvidas e a produção de ovos foi prontamente observada na suscetível, porém esse desenvolvimento não foi facilmente observado nas raízes da planta resistente. Quanto aos níveis de transcritos de MIC, foi observado que houve uma diminuição ainda maior em comparação a 28 dias.

4 METODOLOGIA

4.1 Acessos de *Gossypium* spp.

Foram utilizados nos experimentos 30 acessos de *Gossypium* spp. pertencentes aos bancos de germoplasma da Embrapa Algodão e do CIRAD (França), cujas espécies e origens estão incluídas na Tabela 1. Foram escolhidas como padrões de suscetibilidade a variedade Fibermax 966 (FM 966), e de resistência, o acesso M-315.

4.2 Identificação da espécie e produção do inóculo do nematoide

A população de *Meloidogyne incognita* raça 3 foi coletada em Londrina (Estado do Paraná) e escolhida devido à sua alta patogenicidade ao algodoeiro nesse Estado. A identificação da espécie foi feita através do fenótipo das esterases (Est) (Carneiro & Almeida, 2001) e do marcador SCAR (sequence-characterized amplified region) (Randig *et al.*, 2002). A raça foi determinada usando-se o teste com hospedeiros diferenciadores (Tabela 2), de acordo com a metodologia proposta por Hartman & Sasser (1985). Os ovos desta população foram extraídos pelo método de Hussey & Barker (1973) modificado por Boneti & Ferraz (1981) com 0,5 % de hipoclorito de sódio (NaOCl) e a concentração de ovos determinada em lâminas de Peters ao microscópio ótico. Para os testes histopatológicos, foram obtidos J2, através da eclosão de ovos depositados em funil de Baermann modificado os quais foram utilizados como inóculo (Flegg, 1967).

Tabela 1: Descrição dos genótipos/aceessos de *Gossypium* spp. avaliados nos experimentos de seleção de resistência ou suscetibilidade a *Meloidogyne incognita* raça 3.

Genótipo/Acesso	Espécie	Origem
Algodão del Pais n°3	<i>G. barbadense</i> raça <i>barbadense</i>	Peru/Banco CIRAD n° 1348 – Algodão selvagem
AS 0110 n°1	<i>G. hirsutum</i> raça <i>marie galante</i>	Haiti / Banco do CIRAD n° 6098 – Algodão selvagem
AS 0188	<i>G. hirsutum</i> raça <i>marie galante</i>	Guadalupe / Banco do CIRAD n° 6172 – Algodão selvagem
AS 0189	<i>G. hirsutum</i> raça <i>marie galante</i>	Guadalupe / Banco do CIRAD n° 6173 – Algodão selvagem
AS0190	<i>G. hirsutum</i> raça <i>marie galante</i>	Guadalupe (multiplicada em Montpellier) /Banco do CIRAD – Algodão selvagem
AS 0190 n°1	<i>G. hirsutum</i> raça <i>marie galante</i>	Guadalupe/Banco do CIRAD n° 6174 – Algodão selvagem
AS 0190 n°2	<i>G. hirsutum</i> raça <i>marie galante</i>	Guadalupe/Banco do CIRAD n° 6174 – Algodão selvagem
AS 0191	<i>G. hirsutum</i> raça <i>marie galante</i>	Guadalupe / Banco do CIRAD n° 6175 – Algodão selvagem

Auburn 56	<i>G. hirsutum</i> raça latifolium	USA/Cultivar obsoleta resistente ao complexo Fusnem
China 13-9	<i>G. arboreum</i>	China/ Banco CIRAD nº 1550
Cleviewilt-6	<i>G. hirsutum</i> raça latifolium	USA/ Cultivar obsoleta resistente ao complexo Fusnem
CNPA GO 2002-2043	<i>G. hirsutum</i> raça latifolium	Linhagem do programa de melhoramento da Embrapa Algodão
DeltaOpal	<i>G. hirsutum</i> raça latifolium	Estados Unidos/Empresa Deltapine/Cultivar comercial
Deltapine 61	<i>G. hirsutum</i> raça latifolium	Estados Unidos/Empresa Deltapine/Cultivar comercial
F1 AS 0110 nº1 X M-315	<i>Hibrido inter racial</i>	Cruzamento Embrapa Algodão
F1 AS 0190 nº2 X M-315	<i>Hibrido inter racial</i>	Cruzamento Embrapa Algodão
F1 FM 966 X AS 0110 nº1	<i>Hibrido inter racial</i>	Cruzamento Embrapa Algodão
F1 FM 966 X AS 0190 nº2	<i>Hibrido inter racial</i>	Cruzamento Embrapa Algodão

Fai Mui	<i>G. arboreum</i>	China/ Banco CIRAD nº 1549 Cultivar obsoleta
FM 966 (testemunha)	<i>G. hirsutum</i> raça latifolium	Austrália/ Empresa Bayer Cropsience/ Cultivar comercial
Guazuncho 2	<i>G. hirsutum</i> raça latifolium	Argentina/ INTA/Cultivar comercial
LA RN-1032	<i>G. hirsutum</i> raça latifolium	Estados Unidos/linhagem da Empresa Stoneville/
LA-887	<i>G. hirsutum</i> raça latifolium	Empresa Stoneville/ Cultivar comercial obsoleta
M315 (testemunha)	<i>G. hirsutum</i> raça latifolium	Estados Unidos/linhagem altamente resistente ao nematoide das galhas
MT121 Bulk nº6	<i>G. barbadense</i> raça brasiliensis	Mato Grosso /Coleta da Embrapa Algodão – Algodão Selvagem
MT123 nº3	<i>G. barbadense</i> raça brasiliensis	Mato Grosso /Coleta da Embrapa Algodão – Algodão Selvagem
Semi Áspero Huanuco	<i>G. barbadense</i> raça barbadense	Peru/ Banco CIRAD nº 1343 – Algodão Selvagem
TX-25	<i>G. hirsutum</i> raça punctatum	México/Algodão selvagem

VH8-4602	<i>G. barbadense</i> raça barbadense	Variedade obsoleta (ilhas de Antigua)
Wild Mexican Jack Jones	<i>G. hirsutum</i> (raça desconhecida)	México/Algodão selvagem

Tabela 2: Teste para determinação de raças de *Meloidogyne incognita* em plantas hospedeiras diferenciadoras, segundo Hartman & Sasser (1985).

<i>M. incognita</i>	Plantas hospedeiras diferenciadoras ^a					
	Algodão	Fumo	Pimentão	Melancia	Amendoim	Tomate
Raça 1	-	-	+	+	-	+
Raça 2	-	+	+	+	-	+
Raça 3	+	-	+	+	-	+
Raça 4	+	+	+	+	-	+

^a Algodão Deltapine 61; NC 95; Pimentão Early California Wonder; Melancia Charleston Gray; amendoim Florunner; tomate Rutgers. (-) indica resistência do hospedeiro; (+) indica suscetibilidade do hospedeiro.

4.3 Avaliação dos genótipos quanto à reprodução do nematoide em casa de vegetação

Oito plantas de cada genótipo foram cultivadas individualmente em vasos de 15 cm de diâmetro e 20 cm de altura preenchidos com 50% de terra esterilizada mais 50% do composto Plantimax[®], os quais foram mantidos em casa de vegetação a 22-28°C. A população de nematoides usada como inóculo foi multiplicada previamente em tomateiros (*Solanum lycopersicum*, grupo Santa Cruz, cv Santa Clara) em condições de casa de vegetação. Os ovos foram coletados de raízes de tomateiros com três meses de idade, as quais foram cortados em segmentos e batidas no liquidificador por 1 minuto, em solução 0,5% de NaOCl (Boneti & Ferraz, 1981). Os ovos foram quantificados em lâminas de Peters ao microscópio ótico.

Trinta dias após o plantio dos algodoeiros, 5.000 ovos de *M. incognita* raça 3 foram inoculados na rizosfera de cada planta. As plantas foram mantidas em casa de vegetação em condições de temperatura variando de 25 a 30°C. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com 30 tratamentos (arranjo simples) e oito repetições. As plantas foram irrigadas, fertilizadas e algumas pragas controladas, regularmente. Depois de 120 DAI, foram lavados os sistemas radiculares, avaliada a massa fresca das raízes e essas coradas com Phloxina B e avaliados o índice de galhas e de massas de ovos: 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). O número total de ovos/planta/repetição foi avaliado como descrito anteriormente por Hussey & Barker (1973) com NaOCl a 1%, utilizando-se o método de extração modificado por Boneti & Ferraz, 1981. O fator de reprodução (FR) de cada planta foi calculado, dividindo o número total de ovos/planta (PF) pelo número de ovos inoculados (PI = 5000) (Roberts & May, 1986). As médias do FR foram transformados em $\text{Log}_{10}(x+10)$ e após análise de variância as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As plantas foram classificadas de acordo com esse teste em AS = altamente suscetível, S = suscetível, MR = moderadamente resistente ou R = resistente (Roberts, 2002).

4.4 Histopatologia comparada entre genótipos resistente e suscetível

Considerando-se os resultados do primeiro ensaio, foram escolhidos os germoplasmas Algodão del Pais nº 3 como resistente e a testemunha FM 966 como suscetível.

As avaliações foram realizadas aos 2, 4, 7, 9, 11, 16, 18, 21, 23 e 28, 34 e 45 dias após a inoculação (DAI) retirando-se uma planta resistente e outra suscetível, em cada um desses tempos, de acordo com a técnica descrita por Pegard *et al.* (2005), como se segue: as plantas foram cuidadosamente extraídas do substrato para que as raízes não fossem danificadas. A parte aérea foi cortada e descartada. As raízes foram lavadas em água corrente. Extremidades de raiz, com cerca de 3 mm de comprimento, com ou sem galhas foram retiradas com auxílio de um bisturi e pinça fina, sob microscópio estereoscópico. A seguir, estes segmentos de raiz foram fixadas em solução de 1% (v:v) de glutaraldeído e 4% (v:v) de formaldeído em 100mM de tampão fosfato com pH 7,2, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram mantidos sob agitação durante uma noite completa em agitador rotatório, para melhor penetração das raízes pela solução fixadora, resultando numa melhor fixação, sem a formação de bolhas em seu interior.

Depois de fixadas, as extremidades das raízes foram lavadas por duas vezes, por 30 minutos cada, com tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7.2. A seguir, as raízes foram desidratadas sob agitação em uma série etanólica crescente de 10 a 100%, com intervalos de 20 minutos entre as trocas; os banhos com a concentração de 100% foram repetidos duas vezes. As extremidades de raízes foram embebidas em resina Technovit 7100[®] sob agitação a 4°C, de acordo com o protocolo do fabricante.

Após a retirada das amostras para microscopia ótica, as raízes que restaram de cada tratamento das plantas suscetíveis e resistentes foram coradas com fucsina ácida, para a observação da penetração dos J2 e do desenvolvimento dos mesmos, segundo a metodologia descrita por Byrd *et al.* (1983): As raízes foram

lavadas, mergulhadas em 200 ml de solução aquosa de NaOCl a 5.25% por 4 minutos. Posteriormente, as raízes foram lavadas em água corrente por 45 segundos e mantidas em um béquer com água por 15 minutos para retirar-se o excesso de NaOCl. Em seguida, as raízes foram cortadas e transferidas para um béquer com 2 ml de solução estoque de fuscina ácida (1,25g de fuscina ácida, diluída em 125 ml de ácido acético glacial e 375 ml de água destilada), diluída em 40 ml de água. A solução e as raízes foram aquecidas no microondas por 45 segundos. Depois de resfriadas, as raízes foram descoradas com água quente e transferidas para uma placa de Petri para que fossem observadas ao microscópio estereoscópico. As partes das raízes que mostraram a presença do nematoide foram colocadas em uma lâmina com uma gota de glicerol puro e levadas ao microscópio de luz Axiophot Zeiss, para serem examinadas e fotodocumentadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resistência de genótipos de *Gossypium* spp. a *Meloidogyne incognita* raça 3

Os resultados da reação dos diferentes genótipos à inoculação com *M. incognita* raça 3 estão descritos na Tabela 3. O controle resistente M-315 e os acessos Algodão del Pais nº 3, Auburn 56, F1 AS 0110 nº1 x M-315, Fai Mui, Guazuncho 2, Semi Aspero Huanuco, TX-25 nº1 e Wild Mexico Jack Jones foram considerados resistentes por apresentarem $FR < 1$. Os acessos AS0190 nº1, AS0190 nº2, Clevevilt-6, CNPAGO 2002-2043, DeltaOpal, F1 AS 0190 nº2 x M315, LA RN-1032, LA-887 e MT 123 nº3 foram considerados moderadamente resistentes ($FR = 1,1$ a $4,67$). Foram considerados suscetíveis ($FR = 5,15$ a $11,52$) os acessos FM 966 (testemunha), AS 0191, China 13-9, Deltapine 61, F1 FM966 x AS0190 nº2, F1 FM966 x AS0110 nº1, MT 121 Bulk Nº 6, e VH8 – 4602. Os demais genótipos apresentaram um FR muito alto, pouco comum em plantas de algodoeiro e foram classificados como altamente suscetíveis, superando a testemunha ($FR = 14,05$ a $60,71$): AS0110 nº 1, AS 0188, AS0189, e AS0190 Montpellier. De uma maneira geral, ocorreu uma grande diferença nos FR entre os acessos resistentes e suscetíveis, mostrando com evidência a presença de genes de resistência altamente efetivos em alguns acessos (Tabela 3). Para as três espécies de algodoeiros estudadas, os resultados diferiram bastante daqueles obtidos por outros autores, para os quais os fatores de reprodução foram bem menos variáveis (Carneiro *et al.*, 2005). Por exemplo, os acessos selvagens de *G. hirsutum* marie galante, originárias do Haiti e Guadalupe (Banco de Germoplasma do CIRAD), foram os mais suscetíveis. Não ocorreu um comportamento de compatibilidade ou incompatibilidade total para a mesma espécie de algodoeiro, ou seja, em *G.*

barbadense, por exemplo, ocorreram acessos resistentes, moderadamente resistentes e suscetíveis. O mesmo ocorreu para *G. hirsutum* e *G. arboreum*. Dessa maneira, pode-se concluir que os genes de resistência não estão ligados às espécies de algodoeiro estudadas neste trabalho.

Alguns genótipos testados neste trabalho estão em desacordo com a literatura internacional: o genótipo Auburn 56, considerado suscetível ou moderadamente resistente em alguns trabalhos nos EUA (Shepherd, 1979), foi resistente à população de *M. incognita* raça 3. O acesso Clewewilt 6, considerado como fonte de resistência moderada nos USA (Kirkpatrick & Rothrock, 2001), mostrou-se apenas MR nas condições do nosso trabalho. A cultivar Delta Opal, que foi considerada MR, foi classificada como suscetível por Zanella *et al.* (2005). A cultivar FiberMax 966, sabidamente sensível ao ataque de nematoides (Cia *et al.*, 2007) foi utilizada como padrão compatível no nosso ensaio. As cultivares LA 1032 RN e LA 887, que foram consideradas resistentes nos EUA e foram desenvolvidas de cruzamentos envolvendo Clewewilt 6 como doador resistente, foram apenas MR neste trabalho, seguindo a mesma tendência do progenitor MR (Starr *et al.*, 2007). A resistência moderada do acesso Clewewilt 6 é provavelmente determinada por um gene recessivo (Bezawanda *et al.*, 2003) que confere apenas uma resistência parcial a população de *M. incognita* raça 3 utilizada neste ensaio. O genótipo M-315 referido como resistente em vários trabalhos (Zhou *et al.*, 2000), foi o padrão de resistência do presente ensaio. A análise genética do acesso M-315 derivado de Auburn 634 RNR, indica que a resistência é derivada de dois genes, sendo um proveniente do acesso Clewewilt 6 e outro (dominante) derivado do acesso Wild Mexican Jack Jones (McPherson *et al.*, 1995), extremamente efetivo no controle de *M. incognita* raça 3.

Quanto a reação de resistência do acesso selvagem TX 25, esses resultados estão de acordo com os observados por Robinson *et al.* (2004) e Shepherd (1983). Uma outra razão para os diferentes comportamentos de acessos de algodoeiro deve-se à variabilidade genética de populações de *M. incognita*, e o surgimento de populações mais virulentas, devido ao plantio contínuo do algodoeiro numa mesma área. Isso foi o que ocorreu na Califórnia (Ogallo *et al.*, 1997) e Texas (Zhou *et al.*, 2000). Nesse caso, os isolados com os maiores níveis de reprodução no cultivar resistente Nem X foram encontrados em campos previamente plantados com essa fonte de resistência. Zhou *et al.* (2000) relataram uma variação muito grande no número de galhas e reprodução de diferentes isolados de *M. incognita* em genótipos de algodoeiro resistentes.

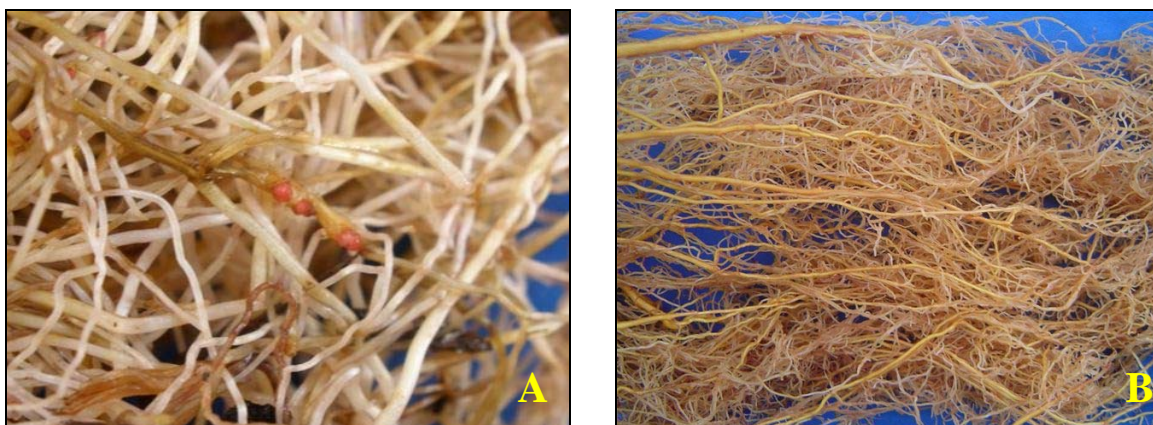


Figura 3: Sintomas e sinais nas raízes de *Gossypium* spp. infestadas com *Meloidogyne incognita* raça 3. A: FM966 (suscetível), B: Algodão del Pais n°3 (resistente).

Tabela 3: Reação de diferentes acessos de *Gossypium* spp. ao nematoide de galhas *Meloidogyne incognita* raça 3, 120 dias após a inoculação com 5.000 ovos/planta, em casa de vegetação.

Genótipo/ Acesso	Peso fresco das raízes(g) ¹	Índice de galha ²	Nº Total de ovos / grama de raiz	Fator de Reprodução (FR) ³	Reação Final ⁴
Algodão Del Pais n°3	59,44	0	1	0,01 d	R
AS 0110 n°1	66,00	3	1.734	21,44 a	AS
AS 0188	90,50	3	1.359	23,97 a	AS
AS 0189	94,13	4	2.127	21,81 a	AS
AS 0190 n°1	87,62	3	325,73	4,59 c	MR
AS 0190 n°2	65,63	4	335	4,67 c	MR
AS0190 Montpellier	39,81	5	7.602	60,71 a	AS
AS 0191	73,94	3	695	12,18 b	S
Auburn 56	26,50	2	45	0,20 d	R
China 13-9	43,50	4	990	8,28 b	S
Clewevilt-6	29,25	3	420	2,58 c	MR
CNPAGO 2002-2043	59,25	4	423	2,05 c	MR
DeltaOpal	51,81	3	321	3,19 c	MR
Deltapine 61	58,81	4	566	7,54 b	S
F1 FM 966 X AS 0190 n°2	65,50	5	811	5,15 b	S
F1 AS 0190 n°2 X M315	63,06	4	364	2,70 c	MR
F1 FM 966 X AS 0110 n°1	84,93	4	934	8,13 b	S
F1 AS 0110 n°1 X M315	72,13	3	14	0,10 d	R
Fai Mui	25,25	1	106	0,48 d	R
FM 966 (testemunha)	34,88	5	1.994	14,05 a	AS
Guazuncho – 2	26,06	2	38	0,18 d	R
LA RN-1032	41,00	4	246	1,11 c	MR

LA-887	62,38	4	81	1,10 c	MR
M-315 (testemunha)	39,00	1	4	0,03 d	R
MT121 Bulk n°6	86,06	5	607	11,12 b	S
MT123 n°3	72,25	3	176	2,87 c	MR
Semi Aspero Huanuco	43,06	2	22	0,19 d	R
VH8-4602	62,44	4	636	7,66 b	S
TX 25 n° 1	73,78	3	4	0,03d	R
Wild Mexican Jack Jones	53,19	1	3	0,03d	R

¹ Valores médios do peso fresco das raízes (g).

² Índice de galhas ou massas de ovos: 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).

³ A média dos valores foram transformados em log (x+1) e tratamentos com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Scott-knot a 5% de probabilidade.

⁴ AS= altamente suscetível, S= suscetível, MR= moderadamente resistente, R= resistente.

5.2 Histopatologia comparada em plantas resistentes e suscetíveis a *Meloidogyne incognita* raça 3

5.2.1 A interação compatível

O exame das radículas coradas com fúccina ácida e aproximadamente 6.300 cortes corados com azul de toluidina demonstraram que os J2s de *M. incognita* foram capazes de penetrar, migrar e se desenvolver normalmente (Fig. 4). Muitos J2 invadiram o meristema subapical das raízes em grupos e atingiram a área vascular diferenciada, desenvolvendo células gigantes bem formadas, multinucleadas e com membranas delgadas (Figura 4 E,F,G,H). Observações das radículas coloridas com fúccina ácida demonstraram a presença de J2s no meristema apical aos 2 DAI (Figura 4A), enquanto que as secções histológicas coradas com azul de toluidina aos 4 DAI revelaram a presença de J2s no córtex das plantas, a caminho do cilindro

central, causando desorganização celular (Figura 4B). Aos 7 e 9 DAI foi possível observar nas raízes coloridas com fuscina ácida, que os J2s já estavam presentes no cilindro central (Figura 4C) e aos 11 e 16 DAI foram observados J2s em fase de alimentação (Figura 4D). Aos 18 DAI, muitos J3/J4 já tinham estabelecido sítios de alimentação, com seis a 14 células gigantes (dependendo do plano do corte) de aspecto normal; numerosos núcleos, citoplasma denso e alguns vacúolos foram observados em seu interior (Figuras 4 E e F). Pequenas galhas apareceram nessa ocasião e J3 e J4 antes de se transformarem em fêmeas já alargavam as regiões dos vasos. Estas células gigantes apresentavam-se com membranas espessas, sobretudo aos 28 DAI (Figuras 4 G.) Galhas contendo fêmeas que se localizavam dentro do cilindro central foram observadas aos 34 DAI. Nessa ocasião, o desenvolvimento de fêmeas causou dano mecânico nos tecidos do parênquima vascular, causando o rompimento do córtex da raiz e expondo as massas de ovos no exterior das raízes infectadas aos 45DAI.

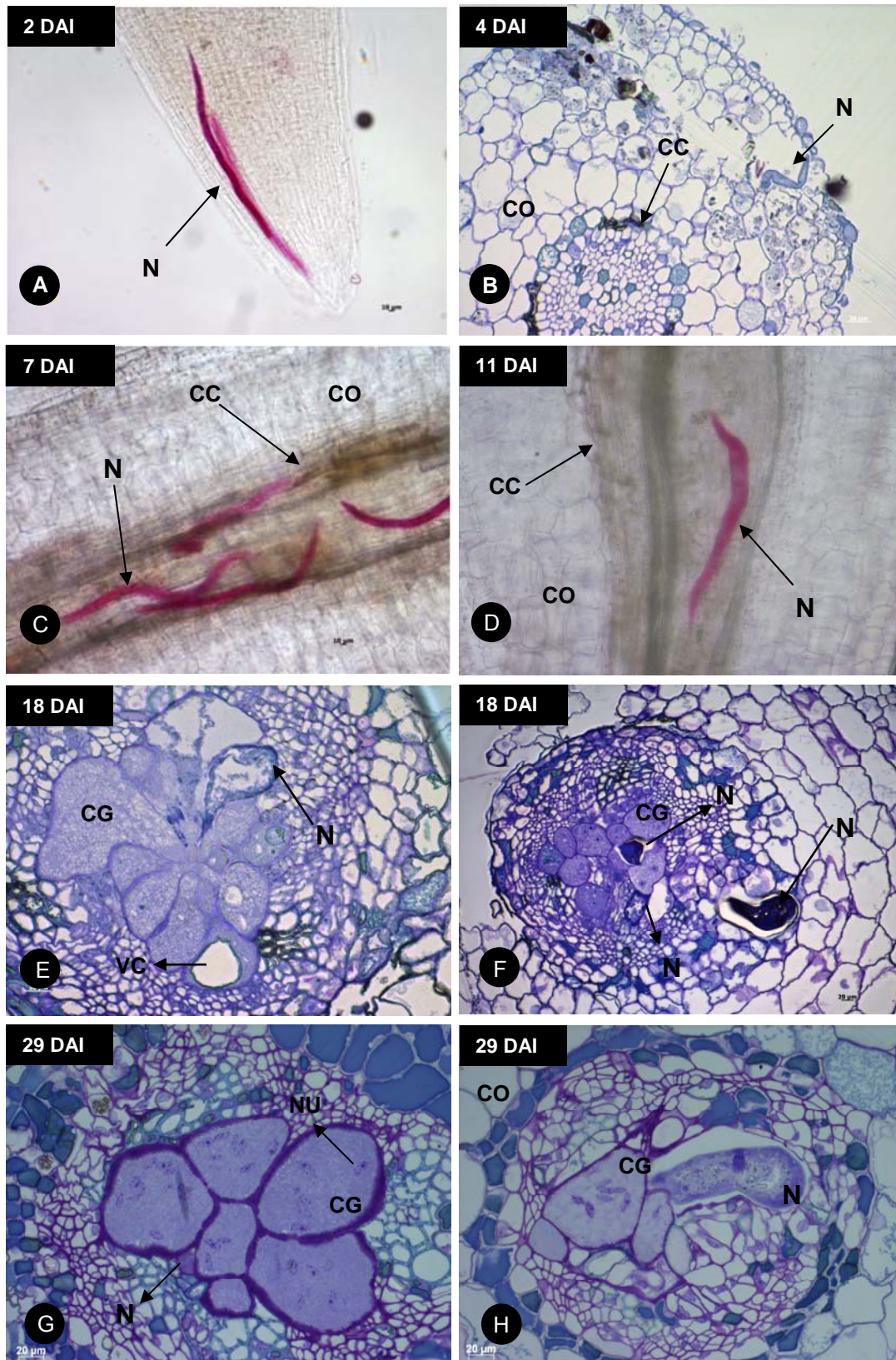


Figura 4: Raízes de *Gossypium hirsutum* suscetíveis (genótipo FM966) inoculadas com *Meloidogyne incognita* raça 3. A, C e D: radicelas coradas com fuccina ácida. B, E e F, G e H: secções coradas com azul de toluidina. Bar = 20μm. N = nematoide, cg = célula gigante, co = córtex, vc = vacúolo, nu = núcleo, cc = cilindro central.

5.2.2 A interação incompatível

As radículas examinadas e coradas com fuscina ácida e aproximadamente 8.500 cortes coloridos com azul de toluidina demonstraram que os J2s de *M. incognita* raça 3 foram capazes de penetrar nas raízes do genótipo resistente. As observações microscópicas no acesso Algodão del Pais nº 3 aos 7 DAI mostraram alguns J2 na região do cilindro central da raiz. Uma fluorescência de cor alaranjada foi observada na microscopia UV e, nos mesmos locais, células fortemente corada pelo azul de toluidina (Figura 5 A,B). Aos 9 DAI, pôde-se observar J2 penetrando no cilindro central, uma fluorescência de coloração amarelada esteve relacionada à penetração do nematoide (Figura 5 C); pode-se observar também a presença de células com citoplasma necrosado devido à penetração do J2 (Figura 5 D). Aos 11 e 21 DAI, uma fluorescência azul clara se intensificou na luz UV e, nos mesmos locais, células foram fortemente coloridas pelo azul de toluidina, circundando completamente o corpo do nematóide e impedindo completamente a formação de células gigantes em muitos cortes (Fig. 5 E,F,G,H). As estruturas do nematoide também se mostraram degeneradas. Aos 21-29 DAI foi também observada à formação de algumas células gigantes em menor número, umas com núcleos, outras sem, mas com membranas celulares que não desenvolveram completamente o espessamento secundário. Nesse momento, pode-se observar ao lado dessas células, a presença de J3 e/ou J4 completamente deformados (provavelmente mal nutridos devido à presença de vacúolos internos) (Figura 5 I). Aos 29 dias foram observadas células gigantes com conteúdo completamente degenerado (Figura 5J) e nematoides completamente deformados. Não foram encontrados adultos aos 34 e 45 DAI.

No acesso Algodão Del Pais nº3 houve um atraso na penetração e desenvolvimento dos J2s (7-21 dias) em relação ao acesso suscetível. Isso demonstra que se trata de uma resistência pós-infeccional, que bloqueou ou dificultou o desenvolvimento após a penetração. Embora a penetração tenha sido semelhante nas duas cultivares, os J2s que penetraram o acesso Algodão del Pais nº 3, não conseguiram se desenvolver em fêmeas adultas. Esse resultado também foi observado por McClure *et al.* (1974) com a cultivar moderadamente resistente Clevevilt 6-3-5 e por Anthony *et al.* (2005) no cafeeiro resistente IAPAR 59 em relação a *M. exigua*. Entretanto, a penetração reduzida em plantas resistentes é um fenômeno relativamente comum na interação planta-nematoide, como em cenoura a *M. javanica* (Huang, 1986), soja a *M. incognita* (Niblack *et al.*, 1986), pimenta a *Meloidogyne* spp. (Bleve-Zacheo *et al.*, 1998, Pegard *et al.*, 2005) e amendoim a *M. arenaria* raça 1 (Anwar & McKenry, 2002, Proit *et al.*, 2008).

A resposta de incompatibilidade pós-penetração nas raízes de Algodão del Pais nº 3 foi considerada, inicialmente, como uma defesa bioquímica muito ativa que bloqueou o desenvolvimento e reprodução do nematoide. Essa resposta de incompatibilidade pode ser considerada como uma clássica reação de hipersensibilidade (RH). Essa RH foi observada com mais intensidade nos estágios de infecção de 7 a 21 dias. Diversos trabalhos mostraram que a RH é responsável pela resistência ao nematoide em outras espécies de plantas, como em tomate (Dropkin, 1969), fumo (Ghannam *et al.* 2005), café (Rodrigues *et al.*, 2000 e Anthony *et al.* 2005), pimenta (Pegard *et al.*, 2005) e amendoim (Proit *et al.* 2008). A RH, no acesso resistente de *G. barbadense*, envolveu formações necróticas fortemente coloridas pelo azul de toluidina, que limitaram a alimentação e o desenvolvimento do

nematoide. Entre as moléculas que contribuem para a defesa da planta contra os nematoides e outros patógenos estão os compostos fenólicos (Bajaj & Mahajan, 1997; Bingefors, 1982; Giebel, 1970; Huang & Rhode, 1973; Kaplan, 1978; Milne *et al.* 1965; Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Paulson & Webster, 1972, Pegard *et al.*, 2005). Neste estudo, os cortes histológicos observados sob a luz UV mostraram uma associação entre compostos fenólicos que aparecem autofluorescentes no acesso resistente Algodão del Pais n° 3. Esses compostos revelavam um cor amarelo ou laranja e se acumularam dentro e nas paredes dos tecidos infectados das raízes resistentes próximos aos nematoides. Essa fluorescência foi observada em estágios iniciais da infecção, intensificando-se dos 7-21 dias ao redor dos J2s. Pegard *et al.* (2005) também observou esses resultados para os J2s, identificando o ácido clorogênico como o principal composto fenólico presente nos extratos de raízes resistentes de pimentão, inoculadas com os nematoides. De acordo com Chang (1969) e Macaron (1975), o ácido clorogênico prejudica a sobrevivência do nematoide e os produtos da oxidação deste fenol reduziram significativamente o consumo de oxigênio pelos mesmos.

Um outro interessante fenômeno foi observado nas raízes do acesso resistente: a presença de pequenos sítios de alimentação ao lado de áreas com RH. Enquanto células gigantes na cultivar suscetível foram facilmente reconhecidas pelo aumento de tamanho, presença de núcleos e vacúolos, no acesso resistente essas células se apresentavam com citoplasma de aspecto degradado e membranas bem menos espessas. Observações semelhantes foram feitas por Carneiro *et al.* (2005) para o genótipo de algodoeiro resistente IAC 96/414. Esses sítios de alimentação pouco diferenciados foram frequentemente associados a nematoides deformados,

que foram observados nos estádios J3/J4. Dessa maneira, dois mecanismos de resistência diferentes foram observados no algodoeiro *G. barbadense*. Resultados similares foram observados para o cafeeiro IAPAR 59 com relação a *M. exigua*. Quanto à cultivar de *G. hirsutum* (M-315), utilizada como padrão de resistência neste ensaio, estudos histopatológicos detalhados não foram realizados, mas foi evidenciado uma redução e atraso do desenvolvimento dos J2s, atraso do ciclo de vida do nematoide e na formação dos sítios de alimentação, sendo formadas poucas fêmeas e poucas galhas (Jenkins *et al.*, 2005). Entretanto, raízes de M 315 tratadas com fuscina acida após 28 DAI mostraram que os J2 não tinham evoluído até o estágio J4, como havia ocorrido na testemunha, M8. Sintomas de raízes necrosadas também foram observadas aos 35 dias na planta resistente (Wubben *et al.*, 2008). Esses resultados sugerem um mecanismo RH, mas mais estudos deverão ser realizados para esclarecer os mecanismos de resistência presentes no acesso M315

De acordo com Robinson *et al.* (2001), estudos sobre resistência e reprodução do nematoide indicam uma rica fonte de genes de resistência a *M. incognita* presentes no germoplasma de *Gossypium*, especialmente nas espécies tetraplóides *G. hirsutum* e *G. barbadense* e na espécie diplóide *G. arboreum*. Devido às diferentes origens do material genético testado neste trabalho, é bem provável que diferentes genes de resistência estejam presentes nos diferentes acessos selecionados (Robinson *et al.*, 2004).

Embora um número similar de J2s tenham penetrado o genótipo resistente (Algodão del país n°3) e suscetível (FM 966), a maior parte dos J2 não conseguiram se desenvolver no genótipo resistente. O mesmo ocorreu para outros acessos de *G. hirsutum* resistente e suscetível (Jenkins *et al.*, 2005). Este trabalho sugere que

o genótipo Algodão del Pais nº3 (*G. barbadense*) apresenta dois tipos de mecanismos de resistência. Um tipo, que bloqueia o desenvolvimento do J2 através da RH e o outro, que impede o desenvolvimento dos J3/J4 em fêmeas adultas e causam má formação das células gigantes e deformidades características nos nematoides. Essas observações diferem um pouco das de Jenkins *et al.* (2005). De acordo com os estudos realizados por esses autores, a expressão da resistência ao nematoide das galhas no algodoeiro M-315 (*G. hirsutum*) foi associada com dois períodos importantes no desenvolvimento do ciclo de vida dos nematoides: 1º) o período de transição dos J2 para o estágio J3/J4 e 2º) o período que compreende da transição de J4 para fêmeas adultas sem ovos para o estágio de fêmeas maduras com ovos. A primeira fase está de acordo com os resultados deste trabalho. Mas na segunda, não foram praticamente observadas fêmeas e sim J3/J4, completamente degenerados ao lado de células gigantes mal formadas. Essa hipótese concorda com o modelo proposto por McPherson *et al.* (2004), que relata 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 Clevevilt 6-1 (Mi-C07) no cromossomo 7 (Shen *et al.*, 2006). No caso do Algodão del Pais nº 3, provavelmente, devem ocorrer também ao menos 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.

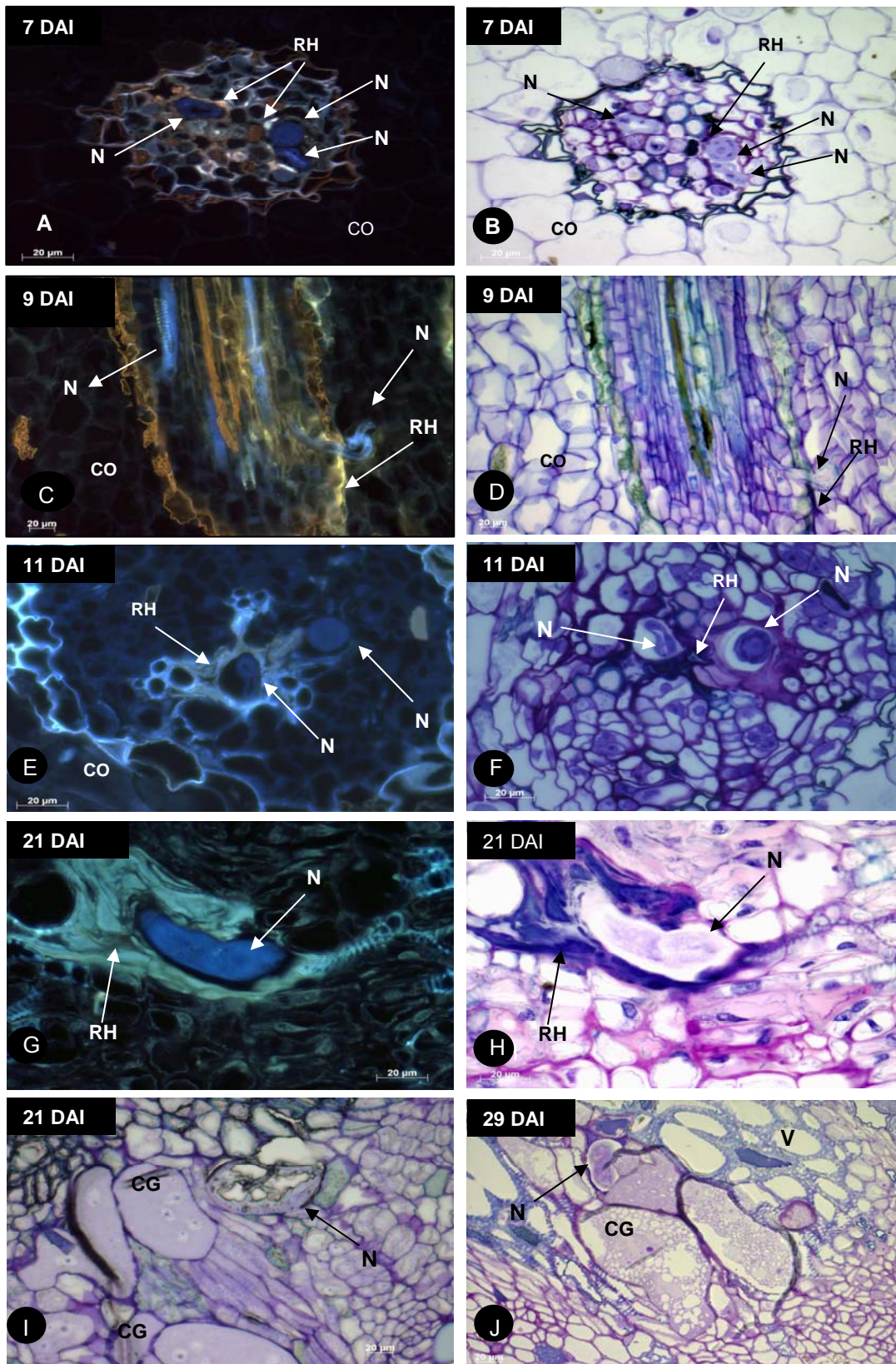


Figura 5: Secções de raízes de *Gossypium barbadense* (acesso Algodão del Pais nº 3) inoculadas com *Meloidogyne incognita* raça 3. A, C, E e G: secções não coradas observadas à UV. B, D, F, H, I e J: secções coradas com azul de toluidina. Bar = 20µm. N = nematoide, cg = célula gigante, co = córtex, RH= reação de hipersensibilidade.

6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou uma grande variabilidade entre os acessos de *Gossypium* spp quanto à resistência e suscetibilidade ao nematoide das galhas *Meloidogyne incognita* raça 3.

A resistência do acesso Algodão del Pais nº 3 atrasou o ciclo de *M. incognita* raça 3 e foi associada a dois mecanismos de resistência pós-infectivos, bioquímicos, que provocaram uma resposta de hipersensibilidade aos 7-21 DAI, relacionada a compostos fenólicos, os quais, aparentemente foram responsáveis por bloquear o desenvolvimento dos J2 a J3 e/ou J4 e destes para fêmeas adultas com ovos. Um segundo mecanismo causou a formação de células gigantes degeneradas ao lado de J3/J4 deformados, provavelmente mortos.

Embora o acesso Algodão del Pais nº 3 não tenha sido imune, o fator de reprodução foi muito baixo e não foram observadas fêmeas aos 34/45 DAI. Isso significa que um número muito baixo de fêmeas pôde se formar.

7 PERSPECTIVAS PARA ESTUDOS FUTUROS

Estudos futuros visarão a caracterização biológica e genética da resistência (expressão gênica) nos acessos de algodoeiro identificados como altamente resistentes a *M. incognita* raça 3, assim como a identificação de marcadores moleculares associados à resistência para auxiliar a introgressão da resistência em genótipos melhorados.

Estudos complementares buscarão a análise dos compostos fenólicos das raízes do acesso suscetível (FM966) e resistente (Algodão del Pais nº 3), inoculados e não inoculados através da técnica de análise de cromatografia dos compostos fenólicos, a fim de esclarecer com mais detalhes, as substâncias químicas envolvidas no mecanismo de resistência encontrado nos acessos de *Gossypium* spp. analisados neste trabalho.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrão MM, Mazzafera P (2001) Efeitos do nível de inóculo de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. *Bragantia*, Campinas 60(1): 19-26.

Almeida WP, Pires JR, Ruano O, Turkiewicz L, Santos WJ, Yamaoka RS (2001) IPR 94, IPR 95, e IPR 96: novas cultivares paranaenses de algodoeiro. In: III Congresso Brasileiro de Algodão, Abstract Books. Campo Grande, MS. 2:849-852.

Almeida WP, Pires JR, Ruano O, Turkiewicz L, Yamaoka RS, Santos WJ; Marur CJ, Mehta YR, Costa A, Cia E, Oliveira AB, Lüders RR (2009) IPR 140: Cultivar com resistência/tolerância aos nematoides *Rotylenchulus reniformis* e *Meloidogyne incognita*. VII Congresso Brasileiro do Algodão, Foz do Iguaçu, PR. pp.1606.

Almeida WP, Pires JR, Ruano O, Turkiewicz L, Yamaoka RS, Santos WJ; Marur CJ, Mehta YR, Costa A, Cia E, Oliveira AB, Lüders RR (2009) IPR JATAI: 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.

Anthony F , Topart P, Martinez A , Silva M, Nicole M (2005) Hypersensitive-like reaction conferred by the Mex-1 resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. *Plant Pathology* 54(4): 476-482.

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

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

Bajaj KL, Mahajan R (1977) Phenolic compounds in tomato susceptible and resistant to *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White). Chitwod. In: Bajaj KL, Arora YK, Mahajan R (1983) Biochemical differences in tomato cultivars resistant and susceptible to *Meloidogyne incognita*. *Revue Nématologie* 6(1):143-154.

Beltrão NEM, Azevedo DMP (2008) (Ed.) O agronegócio do algodão no Brasil. 2ª Ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.

Beltrão, NEM (1999) O agronegócio do algodão no Brasil. Brasília: Embrapa – CTT/EMBRAPA-CNPA. 2:55.

Bezawada, C, Saha, S, Jenkins, JN, Creech, RG & McCarty, JC (2003). SSR markers associated with root-knot nematodes resistance genes in cotton. *Journal of Cotton Science* 7:179-184.

Bingefors S (1982) Nature of inherited nematode resistance in plants. In: Harris KF, Maramorosh, K (Eds) *Pathogens vectors and plant diseases: Approaches to control*. Academic Press, New York. pp. 187-219.

Bleve-Zaccheo T, Bongiovanni M, Melillo MT, Castagnone-Sereno P (1998) The pepper resistance genes *Me1* et *Me3* induce differential penetration rates and temporal sequences of root cell ultra-structural changes upon nematode infection. *Plant Science* 133:79-90.

Boneti JIS, Ferraz S (1981) Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne incognita* de raízes de cafeeiros. *Fitopatologia Brasileira* 6:553.

Brubaker CL, Bourland FM, Wendel JF (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 MO (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.

Byrd DW, Kirkpatrick T, Barker KR (1983) An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15(1): 142-143.

Callahan FE, Jenkins JN, Creech RG, Lawrence GW (1997) Changes in cotton root proteins correlated with resistance to root knot nematode development. *J Cot Sci* 1:38-47.

Carneiro RG, Antonio H, Brito JA, Alteia AAK (1990) Identificação de espécies e raças fisiológicas de *Meloidogyne* na região noroeste do estado do Paraná: resultados preliminares. Congresso Brasileiro de Nematologia 14:4. Resumo.

Carneiro RMDG, Almeida MRA (2001) Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécie. *Nematologia Brasileira* 25(1): 35-44.

Carneiro RMDG, Neves DI, Falcão R, Paes NS, Cia E, Sá MFG (2005) Resistência de genótipos de algodoeiro a *Meloidogyne incognita* raça 3: Reprodução e histopatologia. *Nematologia Brasileira* 29(1): 1-10.

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

Chang LM (1969) The repellent effect of necrotic tissue on the nematode, *Pratylenchus penetrans* (Cobb, 1917), Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941. In: Kaplan DT, Keen NT (1980) Mechanisms conferring plant incompatibility to nematodes. *Revue Nématologie* 3(1): 123-134.

Cia E, Galbieri R, Fuzatto MG, Lüders RR, Kondo JI, Carvalho LH, Ruano O, Almeida WP, Ito MF, Oliveira AB, Cunha HF, Chiavevato EJ, Aguiar PU, Mehta YR, Martins ALM, Pettinelli Junior A, Bolonhezi, D, Foltran DE, Kasai FS, Ito MA, Michelotto MD, Bortoletto N, Gallo PB, Reco PC, Souza PS, Rossetto R, Freitas RS, Furlani Junior E, Lebedenco A, Pedrosa MB, Lanza MA (2007) Comportamento de genótipos de algodoeiro na presença de patógenos e nematóides. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibras* 11:99-109.

Cia E, Gridi-Papp IL, Chiavevato EJ, Sabino NP, Kondo JI, Pizzinato MA, Bortoletto N, Carvalho LH (2001) Melhoramento do algodoeiro no Estado de São Paulo: obtenção da cultivar IAC 21. *Bragantia* 60:9-17.

Cia E, Fuzatto MG, Pizzinato MA, Pettinelli Júnior A, Paulo EM, Zimback L, Silva MA, Bortoletto N & Vasconcelos ASA (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.

Cook R (1991) Resistance in plants to cyst and root-knot nematodes. *Agricultural Zoology Reviews* 4: 213-240.

Cook R, Evans K (1987) Resistance and tolerance. In: Brown RH, Kerry BR (Eds) *Principles and Practice of Nematode control in crops*. Academic Press, Sydney, pp. 179-231.

Coyne DL, Nicol JM, Claudius-Cole B (2007) *Nematologia prática: Um guia de campo e de laboratório*. SP-IPM Secretariat, International Institute of Agriculture (IITA), Cotonou, Benin. 82p.

De Ley P, Blaxter, ML (2002). Systematic position and phylogeny. In: D.L. Lee (ed.) *The Biology of Nematodes*. Taylor and Francis, London: 1-30.

Desenbahia- Diretoria de Desenvolvimento de Negócios, Gerência de Estudos e Assessoria, Unidade de Estudos Econômicos e Pesquisas. Boletim anual do mercado de grãos: *algodão* safra 2008 / 2009. Disponível em: < <http://www.desenbahia.ba.gov.br/estudos/setoriais.asp> > Acesso em: Dezembro de 2009.

Dropkin VH, Helgeson JP, Upper CD (1969) The hypersensitivity reaction of tomatoes resistant to *Meloidogyne incognita*: reversal by cytokinins. *Journal of Nematology* 1(1): 55-61.

Eisenback JD, Triantaphyllou HH (1991) Root-Knot nematode: *Meloidogyne* sp. and races. In: Nickle WR (Ed) *Manual of agricultural nematology*. New York. pp. 191-274.

Fassuliotis G (1979) Plant breeding for root-knot nematode resistance. In: Lambert F, Taylor CE (Eds) *Root-knot Nematodes (Meloidogyne species) Systematics, Biology and Control*. Academic Press, New York, pp. 425-453.

Flegg JJM (1967) Extraction of *Xiphinema* and *Longidorus* species from soil by a modification of Cobb's decanting and sieving technique. *Annual Applied Biology* 60:429-437.

Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*. 9: 275-296.

Furlani Junior E, Lebedenco A, Pedrosa MB, Lanza MA (2007) Comportamento de genótipos de algodoeiro na presença de patógenos e nematoides. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibras* 11:99-109.

Fuzatto MG, CIA E (2001) Algodoeiro: novas cultivares IAC destacam-se pela resistência a doenças. *O agrônomo* 53(4):19-20.

Giebel J (1970) Phenolic content in roots of some Solanaceae and its influence on IAA-oxidase activity as an indicator of resistance to *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica* 16:22-32.

Ghannam A, Jacques A, De Ruffray P, Baillieul F, Kauffmann S (2005) Identification of tobacco ESTs with a hypersensitive response (HR)-specific pattern of expression and likely involved in the induction of the HR and/or localized acquired resistance (LAR). *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 249-259.

Goldfarb M, Amaral FV, Morello CL, Araújo A E, Suassuna ND (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.

Hartman KM, Sasser JN (1985) Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Carter CC, Sasser JN (Eds) *An advanced treatise on Meloidogyne*, vol. II, Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics. pp. 69-77.

Huang CS, Della Vecchia PT, Ferreira PE (1986) Varietal response and estimates of heritability of resistance to *Meloidogyne javanica* in carrots. *Journal of Nematology* 34:28-33.

Huang CL, Rhode RA (1973) Phenol accumulation related to resistance in tomato to infection by root-knot and lesion nematodes. *Journal of Nematology* 5:253-258.

Hussey RS, Barker KR. (1973) A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease. Rep.*, Washington, DC. 57(2):1025-1028.

Hutchinson JB (1951) Intra-specific differentiation in *Gossypium hirsutum*. *Heredity*. 5:163-193.

Hussey RS, Janssen, G.J.W. (2002) Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Starr JL, Cook R, Bridge J. *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. CAB International, Wallingford. pp. 43-70.

Hyer AH, Jorgenson EC (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 MA. (2000) Experiências no manejo de nematoides na cultura do algodoeiro. In: *Congresso Brasileiro de Nematologia. Uberlândia*. pp. 30-31.

Inomoto MM (2001) Algodão: atacado por nematoides. *Revista Cultivar*. 3 (30): 5-7.

Jeffers DP, Roberts PA (1993) Effect of plant date and host genotype on the root-knot – *Fusarium* wilt disease complex of cotton. *Phytopathology* 83:645-654.

Jenkins JN, Creech RG, Tang B, Lawrence GW, McCarty JC (1995) Cotton resistance to root-knot nematode : II. Post-penetration development. *Crop Science* 35:369-373.

Jenkins JN, Parrott WL, Kappelman AJ, Shepherd R (1979) Registration of JPM 781-78-3 cotton germplasm. *Crop Science* 19: 932.

Kaplan DT (1978) Characterization of soybean incompatibility to *Meloidogyne incognita* and its association to glyceollin accumulation in infect root tissue. Ph.D. dissertação. University of California, Riverside.

Karssen G, Moens M (2006) Root-Knot Nematodes In: Perry RN, Moens M (Eds) *Plant Nematology*, Cambridge, USA, CABI North American Office., pp.60-90.

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

Koenning SR, Barker KR, Bowman DT (2001) Resistance as a tactic for management of *Meloidogyne incognita* on Cotton in North Carolina. Journal of Nematology 33(2-3):126-131.

Lerayer A (2007) Guia do Algodão: Tecnologia no campo para uma indústria de qualidade. Conselho de informações sobre biotecnologia. pp 2-16. Disponível em: <http://www.cib.org.br/pdf/guia_algodao.pdf> Acesso em: Novembro de 2009.

Lordello RRA, Lordello AIL, Cia E, Fuzzatto MG (1984) Avaliação da resistência de algodoeiro a nematoides de galhas. Congresso Paulista de Fitopatologia, Botucatu. Summa Phytopathologica 10(1,2):19. Resumo.

Lubbers EL, Chee PW (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.

Macaron J (1975) Étude de la résistance de deux variétés de tomate aux *Meloidogyne* spp. et au *Phytophthora parasitica*. In: Kaplan DT, Keen NT (1980) Mechanisms conferring plant incompatibility to nematodes. Revue de Nématologie. 3(1): 123-134.

Maggenti A (1981) General Nematology. New York: Springer-Verlag.

McClure MA, Ellis KC, Nigh EL (1974) Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne incognita* in resistant cotton. Journal of Nematology 1:21-26.

McPherson GR (1993) Inheritance of root-knot nematode resistance in cotton as determined by combining ability, generation mean and Mendelian analysis. Ph.D. dissertation, Mississippi State Univ., Mississippi State (DAI-B 54/08).

McPherson MG, Jenkins JN, McCarty JC, Watson CE (1995) Combining ability analysis of root-knot nematode resistance in cotton. *Crop Science* 35: 373-375.

McPherson MG, Jenkins JN, Watson CE, McCarty JC (2004) Inheritance of root-knot nematode resistance in M-315 RNR and M78-RNR cotton. *Journal of Cotton Science* 8:154–161.

Milne DL, Boshoff DN, Buchan PWW (1965) The nature of resistance of *Nicotiana repanda* to the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. *S. Afr. Agric. Sci* 8:557-567.

Monjtahedi H, Santo GS, Wilson JH (1988) Host tests to differentiate *Meloidogyne chitwoodi* races 1 and 2 and *M. hapla*. *Journal of Nematology* 20:468-473.

Muniz MFS, Campos V.P., Moita AW, Gonçalves, GW, Almeida MRA, Sousa FR & Carneiro RMDG (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.

Niblack TL, Hussey RS, Boerma HR (1986) Effects of environments, *Meloidogyne incognita* inoculum levels, and *Glycine max* genotypes on root-knot nematode-soybean interactions in field microplots. *Journal of Nematology* 18:338-346.

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.

Nicholson RL, Hammerschmidt R (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Reviews Phytopathology* 30:369-389.

Oakley SR (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 JL, Goodell PB, Eckert J, Roberts PA (1999) Management of root-knot nematodes with resistance cotton cv. NemX. *Crop Science* 39:418-421.

Ogallo JL, Goodell PB, Eckert J, Roberts PA (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. 2009.

Paulson RE, Webster JM (1972) Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato, *Lycopersicon esculentum* L., to infection by the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Physiol. Plant Pathology* 2:227-234.

Pegard A, Brizzard G, Fazari A, Soucaze O, Abad P, Djan-Caparolino C (2005) Histological Characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annum*. *Phytopathology* 95(2): 158-165.

Percival AE, Wendel JF, Stewart JM (1999) In: Smith CW, Cothren JT (Eds.) *Cotton: origin, history, technology and production*. New York: John Wiley and Sons. pp. 33-64.

Percy GR (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 RG, Wendel JF (1990) Allozyme evidence for the origin and diversification of *Gossypium barbadense* L. Theoretical and Applied Genetics, Berlin. 79(4):529-542.

Proite, K., Carneiro, R., Falcao, R., Gomes, A., Leal-Bertioli, S., Guimaraes, P. and Bertioli, D. (2008) Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. *Plant Pathology*, 57:974-980.

Randig O, Bongiovanni M, Carneiro RMDG, 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 RD, Winstead NN (1959) Studies on resistance in tomato to root-knot nematodes and on the occurrence of pathogenic biotypes. *Phytopathology* 49:716-724.

Rhode RA (1972) The expression of resistance in plants to nematode. *Ann. Rev. Phytopathology* 10: 233-252.

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

Roberts PA, Mattews WC, Veremis JC (1998) Genetic mechanisms of host-plant resistance to nematodes. In: Pederson GA, Windham GL, Barker KR (Eds.) *Plant-Nematode Interactions*. Agronomy Society of America, Madison, Wisconsin. pp. 209-238.

Roberts PA, May DM(1986) *Meloidogyne incognita* resistance characteristics in tomato genotypes developed for processing. *Journal of Nematology* 18:353-359.

Roberts PA (1982) Plant resistance in nematode pest management. *Journal of Nematology* 14:24-33.

Robinson AF, Bowman DT, Cook CG, Jenkins JN, Jones JE, May LO, Oakley SR, Oliver MJ, Roberts PA, Robinson M, Smith CW, Starr JL, Stewart J McD (2001) Nematode resistance. In: Kirkpatrick TL, Rothrock CS (Eds) *Compendium of Cotton Diseases*. St. Paul, Minnesota. pp. 68–79.

Robinson AF, Bridges AC, Percival E (2004) New source of resistance to the reniform (*Rotylenchus reniformis* Linford and Oliveira) and root-knot (*Meloidogyne incognita* Kofoid &White, Chitwood) nematode in upland (*Gossypium hirsutum* L.) and Sea Island (*G. barbadense* L.) cotton. *The Journal of Cotton Science* 8:191-197.

Robinson AF, Percival AE (1997) Resistance to *Meloidogyne incognita* raça 3 and *Rotylenchulus reniformis* in wild accessions of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* from Mexico. *Journal of Nematology* 29: 4 (Supl.) 746-755.

Rodrigues ACFO, Abrantes IMO, Melillo MT, Blevé-Zacheo T (2000) Ultrastructural Response Of Coffee Roots To Root-Knot Nematodes, *Meloidogyne Exigua* and *M. Megadora*. *Nematropica* 30(2): 201-210.

Ruano O, Carneiro RG, Brito JÁ, Silva JF, Juliatti FC (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.

Ruano O, Chaves GM, Ferraz S, Zambolim L (1985) Distribuição de raças de *Meloidogyne incognita* em áreas algodoeiras no estado do Paraná e Goiás. *Fitopatologia Brasileira* 10(3): 667-670.

Sasser JN (1980) Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease* 64:36-41.

Seagri - Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. Disponível em: < <http://www.seagri.ba.gov.br/Algodao.htm> > Acesso em: Dezembro de 2009.

Shen X, Becelaere GV, 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 Auburn 623 RNR source. *Theoretical and Applied Genetics* 113 (8): 1539-1549.

Shepherd, RL (1974) Transgressive segregation for root-knot nematode resistance in cotton. *Crop Science* 14:872–875.

Shepherd RL(1979) A quantitative technique for evaluating cotton for root-knot nematode resistance. *Phytopathology* 69:427- 430.

Shepherd RL (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 RL (1983) New sources of resistance to root-knot nematodes among primitive cottons. *Crop Science* 23:999-1002.

Silva CM, Santos MA (1997) Levantamento de nematoides na cultura do algodoeiro. *Nematologia Brasileira*. 21(1): 22-23.

Starr JL, Smith CW (1993) Root-knot nematodes and *Fusarium* wilt: resistance to both pathogens. In: Herber, DJ, Richter, DA (Ed.). (1993) Proc. Beltwide Cotton Production Research Con., New Orleans, LA. 10-14 Jan. Natl. Cotton Council Am. , Memphis, TN. , pp. 178-180.

Starr, JL, Koenning, SR, Kirkpatrick, TL, Robinson, AF, Roberts, PA, Nichols, RL (2007). The future of nematode management in cotton. *Journal of Nematology* 39:283-294.

Taylor AL, Sasser JN (1983) *Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne species)*. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina. pp. 111.

Tihohod D (2000) *Nematologia agrícola aplicada*. Jaboticabal:Funep. pp. 372.

Trudgill DL(1991) Resistance and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annual Review of Phytopathology* 29:167-192.

Vanderplank JE (1978) *Genetic and Molecular Basis of Plant Pathogenesis*. Springer Verlag, Berlin.

Veech JA (1978) An apparent relationship between methoxy-substituted terpenoid aldehydes and the resistance of cotton to *Meloidogyne incognita*. *Nematologica* 24:81-87.

Veech JA (1979) Histochemical localization and nematotoxicity of terpene aldehydes in cotton. *Journal of Nematology* 11: 240-246.

Wendel JF, Albert VC (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 JF, Brubaker C, Alvarez I, Cronn R, Stewart JM (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 OT, 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.

Williamsom VM, Hussey RS (1996) Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell* 8: 1735-1745.

Wingard SA (1953) The nature of resistance to disease. In: *The year-book of Agriculture*, Washington, DC, pp. 165-173.

Wubben MJ, Callahan FE, Hayes RW, Jenkins JN (2008) Molecular characterization and temporal expression analyses indicate that the MIC (*Meloidogyne* induced cotton) gene family represents a novel group of root-specific defense-related genes in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *Planta* 228:111-123.

Zanella CS, Gavassoni WL, Bacchi LMA, Carvalho FC (2005) Resistência de cultivares de algodoeiro ao nematoide das galhas. *Acta Sci. Agron. Maringá* 27(4): 655-659.

Zhang X-D, Callahan FE, Jenkins JN, Ma D-P, Karaca M, Saha S, Creech RG (2002) A novel root-specific gene, MIC-3, with increased expression in nematode-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) after root-knot nematode infection. *Biochim Biophys Acta* 1576:214-218.

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

ANEXOS

RESUMO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA

Algodão: fator de reprodução

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
rep	8	1 2 3 4 5 6 7 8
gen	32	AS0110 AS0188 AS0189 AS0190 AS0190Montpellier AS0191 AlgodaoDelPais3 Auburn56 CNPAGO China-3-9 Clevewilt-6 DeltaOPal DeltaPene61 FM966 FaiMui Guazuncho2 HInterracial-1 HInterracial-2 HInterracial-3 HInterracial-4 HildMexicanJackJones LA887 LARN1032 M315 MT121Bulk6 MT123-3 SemiAspero-Huanunco TX-25-1 TX-25-2 TX-25-3 TX-25-4 VH8-4602

Number of Observations Read	255
Number of Observations Used	255

Dependent Variable: fr

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	38	36463.70107	959.57108	6.78	<.0001
Error	216	30574.35627	141.54795		
Corrected Total	254	67038.05733			

R-Square	0.543925
Coeff Var	170.3891
Root MSE	11.89739
fr Mean	6.982484

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
rep	7	933.93779	133.41968	0.94	0.4745
gen	31	35529.76328	1146.12140	8.10	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
rep	7	944.48736	134.92677	0.95	0.4665
gen	31	35529.76328	1146.12140	8.10	<.0001

Algodão: fator de reprodução

The GLM Procedure

Dependent Variable: lfr

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	38	56.93822644	1.49837438	20.29	<.0001
Error	216	15.94846370	0.07383548		
Corrected Total	254	72.88669013			

	R-Square	Coeff Var	Root MSE	lfr Mean
	0.781188	53.55940	0.271727	0.507337

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
rep	7	0.29596932	0.04228133	0.57	0.7778
gen	31	56.64225711	1.82716958	24.75	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
rep	7	0.29825777	0.04260825	0.58	0.7742
gen	31	56.64225711	1.82716958	24.75	<.0001