

Resistência de Genótipos de Algodoeiro a *Meloidogyne incognita* Raça 3: Reprodução e Histopatologia

REGINA M.D.G. CARNEIRO¹, DINAÉLIA IVA DAS NEVES¹ ROSANA FALCÃO¹,
NORMA SANTOS PAES¹, EDIVALDO CIA² & MARIA DE FÁTIMA GROSSI DE SÁ¹

1. EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P.02372, 70849-970 Brasília, DF.

2. IAC Centro de Grãos e Fibras/Algodão.Bolsista do CNPq. Av. Barão de Itapura 1481, Campinas, SP. - Bolsista do CNPq

Recebido para publicação em 27/11/2004. Aceito em 26/04/2005

Resumo: Carneiro, R.M.D.G; Neves, D.I.; E. Cia & M.F.G. de Sá. 2005. Resistência de genótipos de algodoeiro a *Meloidogyne incognita* raça 3: reprodução e histopatologia.

Genótipos de algodoeiro selecionados pelo IAC foram avaliados quanto a resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3 em experimentos em casa de vegetação. O genótipo IAC 96/414 foi altamente resistente, IAC 20-233 e IAC RR-98/409 foram moderadamente resistentes e IAC 98/708 e IAC 98/732 foram suscetíveis. Essas respostas foram caracterizadas pela reprodução do nematóide, medida pelo número total de ovos por planta e fator de reprodução. Embora juvenis de segundo estágio (J2) tenham penetrado as raízes dos genótipos resistente e suscetível, o desenvolvimento do J2 foi seriamente comprometido no genótipo resistente logo após a infecção. A maioria dos nematóides que penetrou o genótipo IAC 96/414 falhou no estabelecimento e manutenção das células gigantes, as quais apresentaram pequeno tamanho e as paredes celulares com espessamentos secundários reduzidos, não suportando a alimentação de fêmeas normais em ovoposição, resultando em baixa reprodução nos genótipos resistentes.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum*, nematóide das galhas, reprodução, mecanismo de resistência

Summary: Carneiro, R.M.D.G; Neves, D.I.; E. Cia & M.F.G. de Sá. 2004. Resistant genotypes of cotton to *Meloidogyne* race 3: reproduction and histopathology

Selected IAC cotton genotypes were evaluated for resistance to *Meloidogyne incognita*, race 3 in greenhouse experiments. IAC 96/414 was highly resistant, IAC 20-233 and IAC RR 98/409 were moderately resistant and IAC 98/708 and IAC 98/732 were susceptible. Responses were characterized by nematode reproduction, measured by the total number of eggs/ plant and reproduction factor. Although infective root-knot nematode (RKN) juveniles (J2) penetrated the resistant cotton lines similar to susceptible lines, nematode development was arrested in the resistant line soon after infection. Most RKN that penetrated IAC 96/414 failed to establish or maintain giant cells, which presented small size and cell walls without secondary thickenings, not supporting the nutrition of normal ovipositing females, leading to reduced reproduction on resistant genotypes.

Keywords: *Gossypium hirsutum*, root-knot nematode, reproduction, mechanism of resistance

Introdução

O nematóide das galhas *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, 1949 é considerado um patógeno muito

destrutivo para o algodoeiro. Os juvenis de segundo estágio (J2) infectam as raízes causando pequenas galhas e atrofia geral das plantas. Na parte aérea, um sintoma frequentemente induzido pelo parasita é a formação do 'carijó' (clorose

internerval) nas folhas (Silva *et al.*, 1997). Esses autores verificaram que a capacidade produtiva do algodoeiro caía significativamente com o aumento do sintoma 'carijó', em especial, quando este ocorria também nos ponteiros das plantas. Comumente, *M. incognita* interage com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* para causar o complexo Fusnem que em conjunto danificam mais intensivamente a planta do que os dois patógenos separadamente (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).

Embora muitos genótipos de algodoeiro com resistência a *M. incognita* e *F. oxysporum* estejam disponíveis e tenham sido lançados há mais de 30 anos, alto nível de resistência a ambos os patógenos foi raramente incorporado em cultivares comercialmente aceitáveis (Hyer *et al.*, 1979; Roberts, 1992). As tentativas de se incorporar resistência somente ao fungo tiveram pouco sucesso, porque a resistência não foi efetiva na presença do nematóide. Dessa maneira, a resistência ao nematóide é vista como um fator chave no controle do complexo Fusnem (Shepherd, 1986).

Muitos trabalhos feitos entre 1900 e 1975 nos EUA utilizaram como método para selecionar resistência ao nematóide das galhas, o índice de galhas em experimentos realizados a campo. Shepherd (1979) demonstrou que os resultados desses testes foram muito variáveis e colocou em evidência que o índice de galhas era independente da reprodução do nematóide. Alguns genótipos apresentaram alto nível de galhas e baixo número de ovos, outros, baixo número de galhas e alto número de ovos. Baseado nesses resultados, Shepherd (1979) desenvolveu uma técnica para selecionar cultivares resistentes ao nematóide das galhas em casa de vegetação, na qual as variações experimentais poderiam ser melhor controladas do que no campo. Com essa técnica, a quantidade de ovos produzidos foi escolhida como o principal critério de resistência em substituição ao índice de galhas.

No Brasil, muitos trabalhos foram realizados na seleção de cultivares resistentes. Diferentes parâmetros foram utilizados: produtividade, índice de galhas, índice de carijó e resistência múltipla (Ferraz & Lordello, 1961; Fuzatto *et al.*, 1982; Lordello *et al.*, 1982; Almeida *et al.*, 1986; Gridi-Papp *et al.*, 1994; Cia *et al.*, 2003; Ruano & Almeida, 1999), entre outros. Muitos dos resultados obtidos por esses diferentes autores são contraditórios. Alguns trabalhos foram realizados utilizando-se os parâmetros de Shepherd (1979), ou seja, o número total de ovos e fatores de reprodução (Lordello *et al.*, 1986; Ruano & Almeida, 1986; Lordello *et al.*, 1993; Ruano *et al.*, 1992). Entretanto, os trabalhos mais recentes baseados em resistên-

cia múltipla não avaliaram especificamente os fatores de reprodução do nematóide e não recomendaram especificamente cultivares que possam ser utilizadas em áreas infestadas por *M. incognita* raça 3 (Gridi-Papp *et al.*, 1994; Cia *et al.*, 2003; Ruano & Almeida, 1999).

Nos EUA, três cultivares de algodão foram lançadas (Acala NemX, Stoneville LA887 and Paymaster 1560) com moderado a alto nível de resistência a *M. incognita*. Apesar do aumento de produtividade e redução do número de nematóides em áreas infestadas (Ogallo *et al.*, 1997, 1999; Zhou *et al.*, 1998), esses cultivares representam apenas 1% de todo o algodão plantado nos EUA em 1999 (Starr *et al.*, 2002).

A proposta deste trabalho foi estudar, em condições controladas, a resistência ou suscetibilidade a *M. incognita* raça 3, de seis genótipos de algodoeiro, desenvolvidos pelo IAC, e previamente selecionados em campos infestados (índice relativo de 'carijó'), avaliando-se o fator de reprodução do nematóide. Visou também, compreender o mecanismo de resistência envolvido, comparando-se a cultivar resistente com a mais susceptível.

Material e Métodos

Caracterização dos genótipos de algodoeiro disponibilizados pelo IAC e selecionados em condições de campo.

Genótipo IAC 96/414: É um híbrido de IAC 20 (originado do Auburn 56, resistente ao complexo Fusarium X Nematóide - x GH 11-9-75) material nunca avaliado para resistência a nematóides no Estado de São Paulo.

Genótipo IAC 20 RR 98/409: Foi selecionado a partir da IAC 20 RR, que mostrou resistência a nematóides e ramulose. Por sua vez, o material IAC 20 RR foi selecionado dentro da cultivar IAC 20.

Genótipo IAC 20-233: Foi selecionado a partir de IAC 20 e é usado como controle resistente para *M. incognita* e *Fusarium*.

Genótipo IAC 20 RR 97/86: Foi selecionado a partir de IAC 20 RR, resistente a ramulose. Foi lançado como IAC 23 em 2001.

Genótipo IAC 98/732: Foi selecionado a partir do material Bulk 38 originário do Paraguai.

Genótipo IAC 98/708: Foi selecionado a partir de Coodetec 401 (Ocepar 92-183)

Esses seis genótipos foram estudados em condições de campo naturalmente infestados, principalmente por *M. incognita*, e uma baixa população de *Rotylenchulus reniformis* Linford &

Oliveira, 1940, em Ituverava-SP e Tatuí-SP. Cada parcela foi constituída de uma linha de 4m de comprimento, tendo 20 plantas como estande inicial, repetida quatro vezes. A avaliação dos sintomas foi feita atribuindo-se uma nota na linha, por dois pesquisadores, de acordo com os sintomas externos, adotando-se uma escala que variou de 1 a 5, sendo nota 1, para plantas sem sintomas visíveis, na linha; nota 2, para plantas com poucas folhas mostrando sintomas de 'carijó' no baixeiro e terço médio da planta; nota 3, para plantas com sintomas de 'carijó' em várias folhas do terço médio e algumas no ponteiro; nota 4, para plantas mostrando muitas folhas com sintomas de 'carijó' inclusive as do ponteiro, e algumas com crescimento reduzido, e nota 5, para plantas com praticamente todas as folhas com sintomas de 'carijó' e crescimento reduzido. A nota média de cada material foi transformada de 0 a 1, conforme Gridi-Papp *et al.* (1994). Para uma melhor visualização da resposta do material, foi utilizado o índice relativo obtido pela relação entre o valor de cada material e a testemunha resistente (Gridi-Papp *et al.*, 1994).

Baseando-se em trabalhos de vários anos, Cia *et al.* (2002) sugeriram uma classificação de resistência conforme o índice relativo obtido, a qual foi utilizada neste trabalho para avaliação de campo, como se segue: índice relativo maior que 1,10: altamente resistente (AR); entre 0,92 a 1,08: resistente (R); entre 0,68 a 0,84: medianamente resistente (MR); entre 0,56 a 0,64: medianamente suscetível (MS); entre 0,28 a 0,52: suscetível (S) e menor de 0,24: altamente suscetível (AS).

Identificação e produção do inóculo do nematóide

Meloidogyne incognita raça 3 foi coletado em Londrina (Estado de Paraná). A identificação da espécie foi feita através do fenótipo das esterases (Carneiro & Almeida, 2001) e teste com hospedeiros diferenciadores (Hartman & Sasser, 1985). Os ovos foram extraídos pelo método de Hussey & Barker (1973) e a concentração de ovos determinada em lâminas de Peters ao microscópio estereoscópico. Para os testes histopatológicos, foram obtidos juvenis de segundo estágio (J2), deixando a suspensão de ovos eclodir em funil de Baermann modificado (Flegg, 1967).

Avaliação dos genótipos quanto à reprodução do nematóide em casa de vegetação

Dez plantas de cada genótipo foram cultivadas individualmente em vasos (15 cm de diâmetro e 20 cm altura) preenchidos com terra esterilizada e mantidos em casa de vegetação a 22-28 °C. Trinta dias depois do plantio, 5000 ovos de *M. incognita* raça 3 foram distribuídos na rizosfera de cada planta. As plantas foram distribuídas em casa de vegetação inteiramente ao acaso.

Depois de 120 dias, foram lavados os sistemas radiculares e as raízes coradas com Phloxina B e então foram estimados os índices de galhas e de massas de ovos: 0 a 5, onde 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 %. O Fator de reprodução foi calculado, dividindo o número total de ovos/planta pelo número de ovos inoculados (5000). O número total de ovos foi transformado em log (x+1) para a análise de variância e os dados analisados pelo Teste de Tukey.

Estudos histopatológicos

Considerando os resultados do primeiro ensaio, o genótipo IAC 96/414 foi escolhido como o cultivar resistente e o genótipo IAC 98/708 como o mais suscetível. Foram inoculadas seis plantas com 25 dias de idade de cada genótipo, utilizando-se 18.000 J2 de *M. incognita* raça 3. As avaliações foram realizadas aos 2, 4, 6, 12, 24 e 48 dias após a inoculação, retirando-se uma planta resistente e outra suscetível, em cada um desses tempos. As extremidades de algumas raízes de cada planta foram cortadas com cerca de 3 mm de comprimento, clarificadas e coloridas pela metodologia descrita por Byrd *et al.* (1983). A seguir, foram observadas e fotografadas ao microscópio ótico. Outras radicelas da mesma planta foram fixadas em solução contendo 2,5% de glutaraldeído (v/v) em 0,1 M do tampão cocodilato p 7,2 por 24 horas, a 4 °C, lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em 1% de OsO₄ (tetróxido de osmium) em água. Após a desidratação na série (10, 30, 50, 70, 80, 90 e 100%) de álcool, os fragmentos de raiz foram embebidos na resina Spurr de baixa viscosidade e a polimerização realizada de acordo com as recomendações do fabricante (Electron Microscopy Science). Secções semi-finas (0,5 µm) foram feitas em micrótomo equipado com navalhas de vidro, transferidas para lâminas de vidro e coloridas com azul de toluidina 1% diluído em água. As lâminas provisórias foram montadas em água e fotografadas ao microscópio ótico.

Resultados e Discussão

Correlações entre os índices relativos de campo, obtidos pelo IAC e os parâmetros utilizados para seleção dos genótipos de algodoeiro em casa de vegetação

Os índices relativos e a respectiva classificação conforme Cia *et al.* (2002), obtidos em condições de campo, encon-

tram-se na Tabela 1.

Os três genótipos suscetíveis (IAC 98/708, IAC 98/732, IAC 20 RR 97/86) e os moderadamente resistentes (IAC 20-233 e IAC 20 RR-98/409) mostraram igual índice de galhas. Apenas o genótipo resistente IAC 96/414 apresentou índice reduzido para essa variável. Entretanto, quando considerados o índice de massas de ovos, número total de ovos e o fator de reprodução, pode-se observar significativa redução desses três parâmetros nos genótipos moderadamente resistentes e resistente, em comparação com os suscetíveis (Tabela 1). Esses resultados confirmam prévios relatos, em que os mecanismos de resistência em plantas de algodão, em geral, não alteram a penetração das raízes pelos juvenis de segundo estágio (J2), mas inibem o desenvolvimento dos J2 em fêmeas adultas (Creech *et al.*, 1995 ; Jenkins *et al.*, 1995). O menor número de galhas no genótipo resistente IAC 96/414 será explicado no próximo item: estudos histopatológicos. Esses resultados confirmam também as observações feitas por Shepherd (1979) que demonstrou que o número de galhas foi independente da reprodução dos nematóides nos cultivares moderadamente resistentes (Tabela 1). Os resultados obtidos em casa de vegetação confirmam parcialmente aqueles obtidos em condições de campo (Cia *et al.*, 2002). Ocorreu uma diferença significativa para o genótipo IAC 20 RR 97/86 que foi resistente em condições de campo e suscetível em condições de casa de vegetação (Tabela 1). Essa diferença pode estar ligada a dois aspectos importantes. Primeiramente, porque a avaliação mediante o índice relativo de 'carijó' em campo, não mede diretamente a população do nematóide. Outro aspecto a ser considerado é a variabilidade genética de populações brasileiras de *M. incognita* (Randig *et al.*, 2002). Trabalhos vêm

demonstrando que a virulência ou agressividade de populações de nematóides de galhas em algodoeiro variaram consideravelmente (Kirpatrick & Sasser, 1983; Elliot, 1999). Quando a resistência é baseada em poucos genes, como é o caso do algodoeiro (McPherson *et al.*, 1995), pode ocorrer uma pressão de seleção e o desenvolvimento de populações virulentas do parasita. O conceito de virulência é usado quando altos níveis de reprodução do nematóide são observados em hospedeiros resistentes. Um aumento da virulência de *M. incognita* ao algodoeiro resistente foi assinalado na Califórnia por Ogallo, *et al.* (1997). Recentemente, Zhou *et al.* (2000) testando diferentes populações de *M. incognita* em diferentes cultivares resistentes demonstraram que alguns isolados provenientes do campo foram mais agressivos do que outros, aumentando o índice de galhas e a reprodução do nematóide nas cultivares resistentes.

Considerando a origem genética da resistência dos genótipos do IAC, pode-se verificar que todos se originaram da cultivar americano Auburn 56. Essa cultivar foi introduzida e estudada no Brasil por volta de 1958 (Cia, informação pessoal) e tem sido usada como fonte de resistência genética ao complexo Fusarium X Nematóide (Fusnem) com excelentes resultados. As cultivares IAC 17, IAC 20 e as mais recentes IAC 23 e IAC 24 foram originadas através de seleção genealógica do Auburn 56. Entretanto, essa cultivar é considerada obsoleta nos programas de resistência genética 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, tais como as da 'Auburn 623' e '634' que apresentam altos níveis de resistência a *M. incognita*, embora não sejam usadas comer-

Tabela 1: Resposta de diferentes genótipos de algodoeiro ao nematóide das galhas *Meloidogyne incognita* raça 3

Genótipos de algodoeiro	Índice Relativo IAC *	Índice de galhas	Índice de massas de ovos	Número total de nematóides **	Fator de reprodução	Reação Final***
IAC 98/708	0,154 (AS)	4,9 (S)	5,0 (S)	58.500a	11,7 a	S
IAC 98/732	0,154 (AS)	4,9 (S)	4,8 (S)	29.500 a	5,9 a	S
IAC 20RR 97/86	0,976 (R)	4,8 (S)	4,4 (S)	33.500a	6,7 a	S
IAC 20-233	1,00 (R)	4,1 (S)	1,1 (MR)	9.500 b	1,9 b	MR
IAC 20RR-98/409	1,265 (AR)	4,6 (S)	1,6 (MR)	8.000 b	1,6 b	MR
IAC 96/414	1,305 (AR)	1,5 (R)	0,2 (R)	1.500 b	0,3 c	R

* Índice Relativo estabelecido pelo IAC (Cia *et al.*, 2002), sendo AS: altamente suscetível, R: resistente e AR: altamente resistente.

** O valores foram transformados em $\log x+1$ e tratamentos com letras diferentes, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

*** S = suscetível, MR = moderadamente resistente, R = resistente

cialmente, por serem agronomicamente inferiores (Koenning *et al.*, 2001). Essas cultivares também foram testadas no Brasil e apresentaram altos níveis de resistência (Lordello *et al.*, 1986 e Ruano & Almeida, 1986), embora, não tenham sido incorporadas nos programas de resistência genética. No Brasil, a resistência conferida pela cultivar Auburn 56 parece satisfatória (Cia, informação pessoal), devendo estar associada a uma menor virulência das populações de *M. incognita* aqui presentes ou a pressões de seleção inferiores às que ocorreram nos EUA.

De maneira geral, recomenda-se que futuras seleções de genótipos de algodoeiro quanto à resistência a *M. incognita* levem em consideração novas fontes de resistência, avaliação do fator de reprodução e utilização de diferentes populações do parasita nas seleções em casa de vegetação e a campo.

Estudos histopatológicos

As observações realizadas aos 2, 4, 6, 12, 24 e 48 dias após a inoculação, em raízes coloridas com Fuccina ácida, mostraram grande número de raízes engrossadas no genótipo susceptível IAC 98/708, em comparação com o genótipo resistente IAC 96/414. Nesse genótipo, muitos engrossamentos estavam vazios e apresentavam um pequeno orifício lateral (Fig. 1B), sugerindo a saída dos juvenis de segundo estágio (J2) das raízes. Não foram observados engrossamentos vazios na cultivar susceptível. Estudos realizados *in vitro* em cultivares resistentes (Clevewilt) e susceptível (Deltapine) por Mc Clure *et al.* (1974), demonstraram, também, a presença de raízes vazias na cultivar resistente e a migração de pequeno número de J2 para fora das raízes. Entretanto, o número reduzido de nematóides encontrados na cultivar resistente não foi atribuído à saída dos J2, e sim à dificuldade desses juvenis penetrarem e se desenvolverem para estádios mais avançados. A presença de barreiras físicas impedindo a penetração dos J2 foi sugerida previamente para uma cultivar de algodão (Anwar *et al.*, 1994).

Aos seis dias após a inoculação, a maioria dos nematóides que penetrou nas raízes do genótipo resistente, não havia saído do estágio de desenvolvimento J2, permanecendo paralelos ao lado do cilindro central das raízes (Fig. 1C). Grande número de fêmeas começou a aparecer 24 dias após a inoculação, no genótipo susceptível (IAC 98/708) e poucos atingiram esse estágio no genótipo resistente, mesmo aos 48 dias após a inoculação.

Aos 6 dias após a inoculação na cultivar suscetível e 12 dias na resistente, as células adjacentes à cabeça do nematóide já haviam começado a produzir cariogênese sem citoquineses, ocorrendo aumento dos núcleos. As células gigantes já eram facilmente reconhecidas como típicas células multinucleadas,

com um denso citoplasma e as membranas com espessura superior às células do parênquima (Figura 2 A-D). No genótipo susceptível, IAC 98/708, aberrações celulares foram associadas com a presença de cada J2 que estabeleceu o seu sítio de alimentação nas células parenquimáticas das raízes (Fig. 2 A, B), ocorrendo uma infecção generalizada do sistema radicular e a produção de um grande número de ovos (Tabela 1).

Após 2, 4, 6, 12, 24 e 48 dias da inoculação, seis tipos de resposta do hospedeiro foram observadas no genótipo resistente (IAC 96/414):

I) A maior parte dos J2 que penetrou nas raízes desse genótipo falhou na indução das células gigantes, e se encontrava estendida no parênquima cortical (Fig. 1C). Foi observado por Mc Clure *et al.* (1974) que na cultivar resistente Clevewilt, muitos J2 foram ináptos para influenciar a divisão nuclear das células do hospedeiro e atingir a maturidade. Os J2 não associados com a hipertrofia e hiperplasia não completaram a segunda muda de cutícula.

II) Após a penetração, a maioria dos J2 permaneceu nesse estágio e não conseguiu estabelecer os sítios de alimentação e se desenvolver, devido provavelmente a compostos tóxicos produzidos na sua vizinhança. Embora a natureza dessa relação seja pouco conhecida, as plantas frequentemente utilizam compostos fenólicos para facilitar ou dificultar interações com outros organismos. Em trabalhos citados por Kaplan & Keen, (1980) foi mostrada que a expressão da incompatibilidade em algodão a *M. incognita* está positivamente correlacionada com o aumento de metoxi - aldeído terpenóide que se acumula nos locais da infecção do nematóide após a penetração, e que, extratos crus desse composto foram tóxicos a *M. incognita*, em ensaios realizados *in vitro*. Sendo assim, a presença de metabólitos secundários envolvidos com o mecanismo de defesa em raízes de algodoeiro, pode estar causando um efeito nematocida ou nematostático, o que explicaria a interrupção do desenvolvimento do J2, e a não formação dos estádios parasitários subsequentes (Fig. 1 C).

III) Não foram observadas necroses, comumente associadas a reações de hipersensibilidade. Ao contrário dos primeiros trabalhos realizados com cultivares de algodão resistentes (Brodie *et al.*, 1960 ; Milton 1962), no genótipo IAC 96/414 a resistência não parece estar associada com o aumento de necroses na raiz. Resultados semelhantes foram observados na cultivar Clevewilt (Mc Clure *et al.*, 1974). Esses autores explicaram que as necroses que aparecem ao longo das raízes são originárias de uma penetração massiva de J2 e essa reação ocorre tanto na cultivar resistente quanto na suscetível, e não parece estar relacionada ao mecanismo de resistência.

IV) Poucos J2 tinham estimulado a formação das células gigantes, no entanto estas eram pequenas, as aberrações celu-

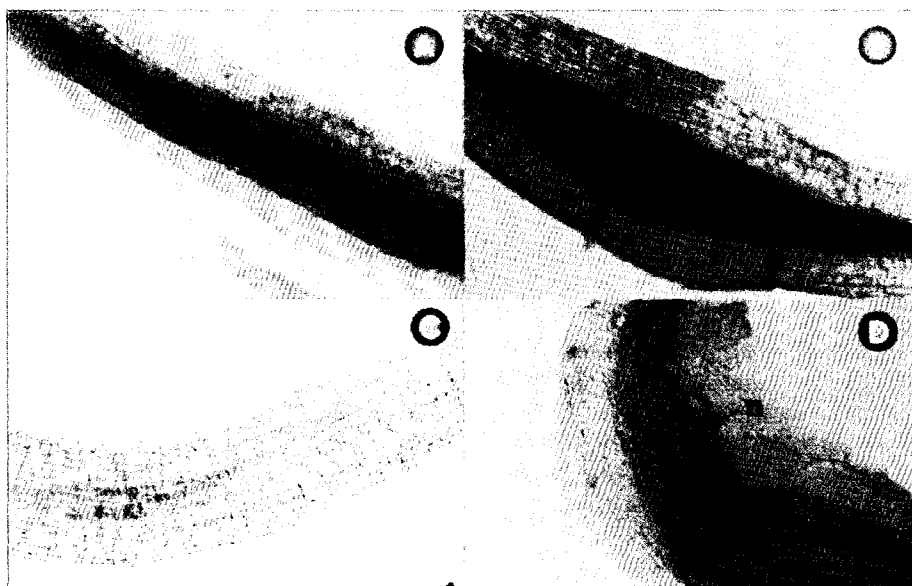


Figura 1. Fotomicrografia de raízes de algodoeiro resistente 'IAC 96/414' após inoculação com *Meloidogyne incognita* raça 3: A) Raízes saudáveis sem nematóide; B) Sintomas de infecção mostrando raízes vazias, 6 dias após a inoculação; C) Raiz com juvenil de segundo estágio, após 4 dias da inoculação. D) Desenvolvimento de machos, 48 dias após a inoculação (Aumento 100 vezes). **n** = nematóide



Figura 2. Fotomicrografia de cortes histopatológicos de raízes de algodoeiro após 12 e 24 dias de inoculação com *Meloidogyne incognita* raça 3: A, B) Genótipo IAC 98/708, susceptível: nematóide e células gigantes com paredes espessas e vários núcleos. C e D) Genótipo IAC 96/414 resistente: células gigantes menores, paredes pouco espessas e vários núcleos (Aumento: 200 vezes). **n** = nematóide, **cg** = célula gigante.

lares não eram extensivas e as membranas celulares não desenvolveram completamente o espessamento secundário (Fig. 2 C, D). Esse tipo de célula gigante não suporta o desenvolvimento de fêmeas até a ovoposição, ou gera fêmeas que produzem um pequeno número de ovos, como já foi observado por Mc Clure *et al.* (1974). Seções feitas nas galhas vazias, também demonstraram células gigantes senescentes e degeneradas após 24 dias, que deixaram grandes cavidades nas raízes, não permitindo a penetração da resina e dificultando a realização de cortes histológicos.

V) Poucos nematóides atingiram a maturidade e depositaram ovos na matriz gelatinosa, mesmo aos 48 dias após a infecção. O mesmo foi observado por Mc Clure *et al.* (1974) na cultivar resistente Clevevilt: poucos J2 conseguiram estabelecer sítios de alimentação precários que levaram o nematóide a um certo grau de desenvolvimento, com reduzida produção de ovos. A maioria dos J2 que não conseguiram se desenvolver se degradaram dentro da planta, resultando aparentemente em uma infecção reduzida do sistema radicular.

VI) Alguns machos se desenvolveram 48 dias após a inoculação (Fig 1 D). Já foi sugerido que a nutrição pode ter um importante papel na diferenciação sexual em alguns nematóides (Davide & Triantaphyllou, 1968). Segundo Kaplan & Keen (1980) a alteração da expressão do sexo, ou seja, o desenvolvimento de machos em nematóides partenogênicos pode ser atribuída a modificações no nível de nutrientes do hospedeiro, e pode estar relacionada com o mecanismo de incompatibilidade de certas plantas a certos nematóides. Diferentes relatos vêm mostrando que fatores anti-nutricionais representados, principalmente, por inibidores de proteinases (orizocistina, esporamina) podem modificar a expressão do sexo, a fecundidade e o desenvolvimento de nematóides endoparasitas sedentários (Atkinson *et al.*, 1995; Urwin *et al.*, 1995, 1997; Vain *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 2003). Esses resultados sugerem que a má formação de células gigantes no genótipo resistente de algodoeiro, assim como a diminuição da fecundidade das fêmeas e aumento do número de machos podem estar relacionados à presença constitutiva ou induzida de potentes inibidores de proteinases nos tecidos das raízes infectadas.

Conclusões

Os genótipos IAC 98/708, IAC 98/732 e IAC 20 RR 97/86 foram suscetíveis a *M. incognita* raça 3. 'IAC 20-233' e 'IAC 20 RR-98/409' foram moderadamente resistentes e apenas o genótipo IAC 96/414 foi resistente. Essas avaliações realiza-

das com base no número total de ovos e no fator de reprodução (FR) diferiram parcialmente das avaliações feitas através do número de galhas e índice de carijó, mostrando que FR foi o parâmetro mais adequado para caracterização da resistência.

Os mecanismos de resistência do genótipo IAC 96/414 se caracterizam primeiramente por uma baixa penetração dos J2. Alguns J2 que conseguiram penetrar falharam no estabelecimento dos sítios de alimentação. As poucas células gigantes formadas foram pequenas com membranas celulares que não desenvolveram completamente o espessamento secundário, ocasionando o desenvolvimento de fêmeas com reduzida produção de ovos.

Literatura Citada

- ALMEIDA W.P.; J.R. PIRES; R.S. YAMAOKA; O. RUANO, & L. TURKIEWICZ. 1986. Comportamento de variedades e linhagens de algodoeiro na presença de nematóides no Estado do Paraná. IN: Reunião Nacional do Algodão, Belém, PA, EMBRAPA/Algodão, 4:21. Resumo.
- ANWAR, S.A. ; D.L. TRUDGILL & M. S. PHILIPPS, 1994. The contribution of variation in invasion and developments rates of *Meloidogyne incognita* to host status differences. Nematologica, 40:579-586.
- ATKINSON, H. J.; M. J. MCPHERSON & P. E. URWIN. 1995. Engineered Resistance to Plant Parasitic Nematodes. Trends in Biotechnology, 13:369-374.
- BRODIE, B.B.; L.A., BRINKERHOFF & F.B. STRUBLE. 1960. Resistance to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita acrita* in upland cotton seedlings. Phytopathology, 50:673-677.
- BYRD, D.W.; T.KIRKPATICK & K.R. BARKER. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. Journal of Nematology, 15:142-143.
- CAI, D. ; T. THURAU ; Y. TIAN ; T. LANGE ; K.W. YEH & C. JUNG . 2003. Sporamin-mediated resistance to beet cyst nematodes (*Heterodera schachtii* Schm.) is dependent on trypsin inhibitory activity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hairy roots. Plant Molecular Biology 51:839-849.
- CARNEIRO, R. G; H. ANTONIO; J.A. BRITO & A.A.K ALTEIA. 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, R.M.D.G. & M.R.A. ALMEIDA. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira*, 25(1):35-44.
- CIA, E.; M.G. FUZATTO; J.I. KONDO; I.L. GRIDI-PAPP; E.J. CHIAVEGATO & M.A. PIZZINATTO. 2003. Desenvolvimento de resistência múltipla a doenças em linhagens avançadas de algodoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 28(4):420-423.
- CIA, E.; M.G. FUZATTO; M.A. PIZZINATTO & N. BORTOLETTO. 2002. Uma escala para classificação da resistência de cultivares a doenças do algodoeiro. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, 28(1):28-32.
- CREECH, R.G.; J.N. JENKINS; B. TANG; G. W. LAWRENCE & J. C. MCCARTY. 1995. Cotton resistance to root-knot nematode: penetration and reproduction. *Crop Science*, 35:365-368.
- DAVIDE, R.G. & A.C. TRIANTAPHYLLOU. 1968. Influence of the environmental on development and sex differentiation of root-knot nematodes. III – Effect of foliar application of maleic hydrazide. *Nematologica*, 14:37-46.
- ELLIOT, C.S. 1999. Virulence of *Meloidogyne incognita* isolates on resistant cotton genotype. M.S.thesis, Clemson University, Clemson, SC.
- FERRAZ, C.A.M. & L.G.E. LORDELLO. 1961. Interferência de nematódeos em culturas de algodão. *Revista de Agricultura*, 36(3):131-138.
- FLEGG, J.J.M. 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.
- FUZATTO, M.G.; E. CIA & I.L. GRIDI-PAPP. 1982. Um método para avaliar a incidência de nematóides no algodoeiro em condições de campo. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 15, 1982, São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 7:569. Resumos.
- GRIDI-PAPP, I.L.; E. CIA; M.G. FUZATTO; E.J. CHIAVEGATO; C. DUDIENTAS; M.A. PIZZINATTO; J.C. SABINO; A.P. CAMARGO & M.P. CAMPANA. 1994. Melhoramento do algodoeiro para resistência múltipla a doenças, nematóides e broca da raiz, em condições de campo. *Bragantia*, Campinas, 53(1):33-45.
- HARTMAN, K. M. & J.N. SASSER. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Carter, C.C. & Sasser, J.N. eds. *An advanced treatise on Meloidogyne*, vol. II, Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics. p. 69-77.
- HUSSEY, R.S. & K.R. BARKER. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Report* 57:1025-1028.
- HYER, A.H.; E.C. JORGENSEN; R. H. GARBER & S. SMITH. 1979. Resistance to root-knot nematode in control of root-knot nematode – *Fusarium* wilt disease complex in cotton. *Crop Science*, 19:898-901.
- JEFFERS, D.P. & P.A. ROBERTS. 1993. Effect of plant date and host genotype on the root-knot - *Fusarium* wilt disease complex of cotton. *Phytopathology*, 83: 645-654.
- JENKINS, J.N.; R.G. CREECH; B. TANG; G. W. LAWRENCE & J.C. MCCARTY. 1995. Cotton resistance to root-knot nematode: post- penetration development. *Crop Science*, 35:365-368.
- KAPLAN, D. K. & N.T. KEEN. 1980. Mechanisms conferring plant incompatibility to nematodes. *Revue de Nématologie*, 3(1):123-134.
- KIRKPATRICK, T.L. & J. N. SASSER. 1983. Parasitic variability of *Meloidogyne incognita* populations on susceptible and resistant cotton. *Journal of Nematology*, 15:302-307.
- KOENNING, S.R.; K.R. BARKER & D.T. BOWMAN. 2001. Resistance as a tactic for management of *Meloidogyne incognita* on Cotton in North Carolina. *Journal of Nematology*, 33(2-3):126-131.
- LORDELLO, R.R.A.; A.I.L. LORDELLO; E. CIA & M.G. FUZATTO. 1982. Relação entre o algodoeiro e *Meloidogyne incognita* raça 3. Reunião Nacional de Algodão, 2, 1982, Salvador. EMBRAPA/Algodão, Campina Grande, p.24. Resumo.
- LORDELLO, R.R.A.; A.I.L. LORDELLO; E. CIA & M. G. FUZATTO. 1984. Avaliação da resistência de algodoeiro a nematóides de galhas. Congresso Paulista de Fitopatologia, Botucatu. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, 10(1,2):19, (Resumo).

- LORDELLO, R.R.A.; A.I.L. LORDELLO; E. CIA & M.G. FUZATTO. 1986. Reprodução de *Meloidogyne incognita* em variedades de algodoeiro. Nematologia Brasileira, 10:19-20. Resumo.
- LORDELLO, A.I.L.; R.R.A. LORDELLO; E. CIA, & M.G. FUZATTO. 1993. Resistência a *Meloidogyne incognita* em genótipos de algodoeiro. Nematologia Brasileira, 17(1):10-11. Resumo.
- MC CLURE, M. A., ELLIS, K.C. & NIGH, E.L. 1974. Resistance of cotton to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology 6 (1):17-20.
- MC PHERSON, GR.; J.N. JENKINS; J.C. MARTY & C.E. CLARENCE. 1995. Combining ability analysis of root – knot nematodes resistance to cotton. Crop Science, 35:373-375
- MILTON, N.A. 1962. Factors influencing resistance of cotton to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Phytopathology, 52:272-279.
- OGALLO, J. L.; P.B. GOODELL; J.ECKERT & P.A. ROBERTS. 1997. Evaluation of Nem X, a new upland cotton cultivar with high resistance to *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology, 29:531-537.
- RANDIG, O., M. BONGIOVANNI, R.M.D.G. CARNEIRO & P. CASTAGNONE-SERENO. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. Genome, 45:862-870.
- ROBERTS, P.A. 1992. Current status of availability, development and use of host plant resistance to nematodes. Journal of Nematology, 24:213-227.
- RUANO, O. & W.P. ALMEIDA. 1999. Sistema para avaliação de resistência múltipla em genótipos de algodoeiro a nematóides e doenças foliares, em casa de vegetação. do Congresso Brasileiro de Algodão, 2. Anais, Ribeirão Preto. EMBRAPA/Algodão, Campina Grande, p. 488-491.
- RUANO, O. & W. P. ALMEIDA. 1986. Fontes de resistência em germoplasma de algodoeiro a *Meloidogyne incognita* - Raça 3. IN: Reunião Nacional do Algodão, 4, 1986, Belém, PA. EMBRAPA/Algodão, Campina Grande, p.22. Resumo.
- RUANO, O.; G.M. CHAVES; S. FERRAZ. & L. ZAMBOLIM. 1985. Distribuição de raças de *Meloidogyne incognita* em áreas algodoeiras nos estados do Paraná e Goiás. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 10 (3):667-670.
- RUANO, O; R.G. CARNEIRO; J.A. BRITO & J.F.V. SILVA. 1992. Nematóides na cultura do algodoeiro. Informe Agropecuário, 172:48-57.
- SHEPHERD, R.L. 1979. A quantitative technique for evaluating cotton for root-knot nematode resistance. Phytopathology, 69:427-430.
- SHEPHERD, R.L. 1982. Genetic resistance and its residual effects for control of the root-knot nematode – fusarium wilt complex in cotton. Crop Science 22:1151-1155
- SHEPHERD, R.L. 1983. New sources of resistance to root-knot nematodes among primitive cottons. Crop Science, 23:999-1002.
- SHEPHERD, R.L. 1986. Cotton resistance to the root-knot *Fusarium* wilt complex . II Relation to *Fusarium* wilt resistance and its implications on breeding for resistance. Crop Science, 26:228-232.
- SILVA, N.M.; M. G FUZATTO; J.L. KONDO; J.C. SABINO; A. PETTINELLI JUNIOR & P.B. GALLO. 1997. A adubação nitrogenada e o sintoma de nematóides no algodoeiro. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 21(4):693-697.
- STARR, J.L. & C.W. SMITH. 1993. Root-knot nematodes and fusarium wilt: resistance to both pathogens . In D.J. Herber and D. A. Richter (ed.). Proc. Beltwide Cotton Production Research Con., New Orleans, LA. 10-14 Jan. 1993. Natl. Cotton Council Am., Memphis, TN., p. 178-180.
- STARR, J.L.; J. BRIDGE & R. COOK. 2002. Resistance to plant parasitic nematodes: history, current use and future potential . In: Starr, J.L., R. Cook & J. Bridge (ed.). Plant Parasitic Nematodes. CABI, Egham, UK, p. 1-22.
- URWIN, P.E. ; H.J. ATKINSON, D.A. WALLER & M.J. McPHERSON. 1995. Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*. Plant Journal, 8:121-123.
- URWIN, P.E. ; C.J. LILLEY; M.J. McPHERSON & H.J. ATKINSON. 1997. Resistance to both cyst-and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. Plant Journal, 12:455-461.
- VAIN, P.; B. WORLAND; M.C. CLARKE; G.J.D. RICHARD; M. BEAVIS; B. LIU; A. KOHLI; M. LEECH;

- J. SNAPE; P. CHRISTOU; H.J. ATKINSON. 1998. Expression of an engineered cysteine protease inhibitor (Oryzacystatin-IIID86) for nematode resistance in transgenic rice plants. *Theor. Appl. Genet.*, 96:266–271.
- ZHOU, E; J.L. STARR & T.A. WHEELER. 1998. Survey of *Meloidogyne incognita* populations from Texas for aggressiveness on resistant cotton genotypes. In: *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*. Volume 1. Memphis, TN: National Cotton Council, p. 172.
- ZHOU, E, T.A. WHEELER & J.L. STARR. 2000. Root galling and Reproduction of *Meloidogyne incognita* isolates from Texas on Resistant Cotton Genotypes. *Journal of Nematology*, 32(4S):513-518.