

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

Esdras Henrique da Silva<sup>1</sup> Vanessa da Silva Mattos<sup>2</sup> Regina M. D. G. Carneiro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Professores do IFTO – Campus Avançado Pedro Afonso. email:Esdras.silva@ifto.edu.br

<sup>2</sup> Estudante de Doutorado do curso de fitopatologia da Universidade de Brasília.

<sup>3</sup> Pesquisado da Embrapa Cenargem -Brasília

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

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

### 1. INTRODUÇÃO

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

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

gene Mi de resistência em tomateiro (Roberts 1992, Roberts 1995) ou genótipos de feijão caupi com o gene de resistência Rk (Roberts et al., 1995).

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

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

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

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

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

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

### 2.2 Extração de ovos e preparação de DNA: a obtenção de ovos para posterior extração de DNA

seguiu o protocolo descrito por Carneiro *et al.* (2004).

**2.3 Técnica PCR-RAPD:** a técnica PCR-RAPD foi realizada num volume final de 13  $\mu$ l, contendo: 3  $\mu$ l de DNA total [3 ng/ $\mu$ l]; 0,4  $\mu$ l do primer [10  $\mu$ M] (Operon Technologies); 2  $\mu$ l de dNTP [1,25 mM] (Invitrogen); 1,3  $\mu$ l tampão 10X com MgCl<sub>2</sub> (Phoneutria Biotecnologia e Serviços – Pht); 0,2 $\mu$ l da enzima Taq DNA polimerase (5U/  $\mu$ l) (Pht) e 6,1  $\mu$ l de água Milli-Q, no final, em cada reação foi adicionado um gota de óleo mineral. As amplificações foram realizadas em termociclador (PTC-100, MJ Research) programado nas seguintes condições: 5 min. a 94 °C, 40 ciclos de 30 seg. a 94°C, 45 seg. a 36°C, 2 min. a 70°C, e uma elongação final de 10 min. a 70°C (Randig *et al.*, 2002). Os fragmentos amplificados com 22 primers RAPD foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5% (90 mM Tris-básico, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,3) a uma corrente constante de 100 mA por aproximadamente 3 horas e corado com brometo de etídio (0,3  $\mu$ g/ml) e visualizados sob luz UV. Foram utilizados os seguintes primers de RAPD (Operon Technologies) para este estudo: A18, B01, B06, B12, C09, D05, D13, D20, E18, G03, G05, J10, J19, K04, K07, K16, L08, M20, N10, P02, R04 e R07. A escolha dos primers foi aleatória.

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

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

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

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

Do total de 150  $\mu$ l, utilizou-se 1  $\mu$ l do DNA digerido para cada reação. A reação de PCR com DNA digerido e ligado com adaptadores foi realizada em volume final de 25  $\mu$ l, contendo: 1  $\mu$ l de DNA total, 2,5  $\mu$ l de tampão 10X, 1  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> [50 mM], 1  $\mu$ l do primer [10  $\mu$ M], 0,5  $\mu$ l dNTP [10 mM], 0,3  $\mu$ l da enzima Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu$ l), 18,3  $\mu$ l de água Milli-Q, cada reação foi

coberta com óleo mineral para evitar evaporação. O termociclador (PTC-100) foi programado com as seguintes condições: 1 min. a 95 °C; 37 ciclos de 1 min. a 94 °C, 1 min. a 56 °C e 2 min. e 30 seg a 72 °C; e um ciclo de extensão final de 5 min. a 72 °C.

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

**2.6 Análises de polimorfismo:** para cada tipo de marcador, os fragmentos amplificados foram registrados como presente ou ausente a partir das fotografias digitalizadas dos géis, e esses dados foram convertidos em uma matriz binária. A reconstrução filogenética foi realizada utilizando o método filogenético UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), implementado no programa PAUP\* versão 4b10 (Swofford, 2002). Uma análise individual e outra combinada dos três marcadores foi realizada com 1000 repetições de bootstrap para testar a significância do dendrograma obtido. A correlação entre as matrizes de distância genética foram estimadas com o teste de Mantel com 10.000 permutações usando o programa IBDWS (Jensen *et al.*, 2005).

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

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

Nome do acesso	Espécie	Origem do acesso
CIR1348	<i>G. barbadense</i> race barbadense	Peru – wild accession; Cirad acesso n° CIR1348
Clewevilt-6	<i>G. hirsutum</i>	USA – cultivar obsoleta com resistência moderada ao nematoide das galhas
Fibermax966(FM966)	<i>G. hirsutum</i>	Australia – variedade comercial

LA-887	<i>G. hirsutum</i>	USA – cultivar obsoleta com resistência ao nematoide das galhas
M-315 RNR	<i>G. hirsutum</i>	USA – linhagem altamente resistente ao nematoide das galhas
TX-25	<i>G. hirsutum</i> race punctatum	Mexico – acesso selvagem; NPGS PI n° 154035
CIR1343	<i>G. barbadense</i> race barbadense	Peru – acesso selvagem; Cirad acesso n° CIR1343
Wild Mexican Jack Jones (WMJJ)	<i>G. hirsutum</i>	Mexico – acesso selvagem; USDA acesso TX-2516, NPGS PI n° 593649

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

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

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

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

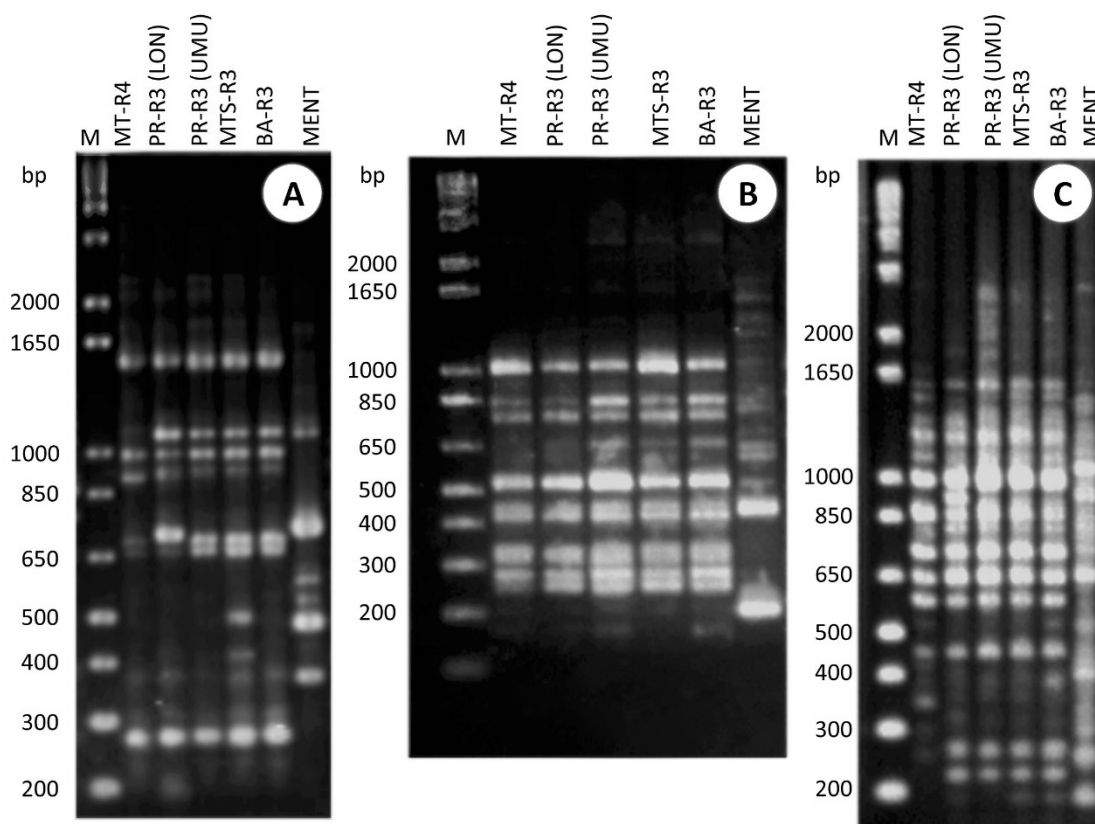
**Caracterização de populações de *Meloidogyne incognita*:** dois fenótipos de esterase foram reconhecidos entre as populações de *M. incognita* de algodão (Tabela 1). O fenótipo I1 com uma banda (Rm: 1,0), foi detectado na população de Londrina enquanto o fenótipo I2 com duas bandas, uma banda principal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

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

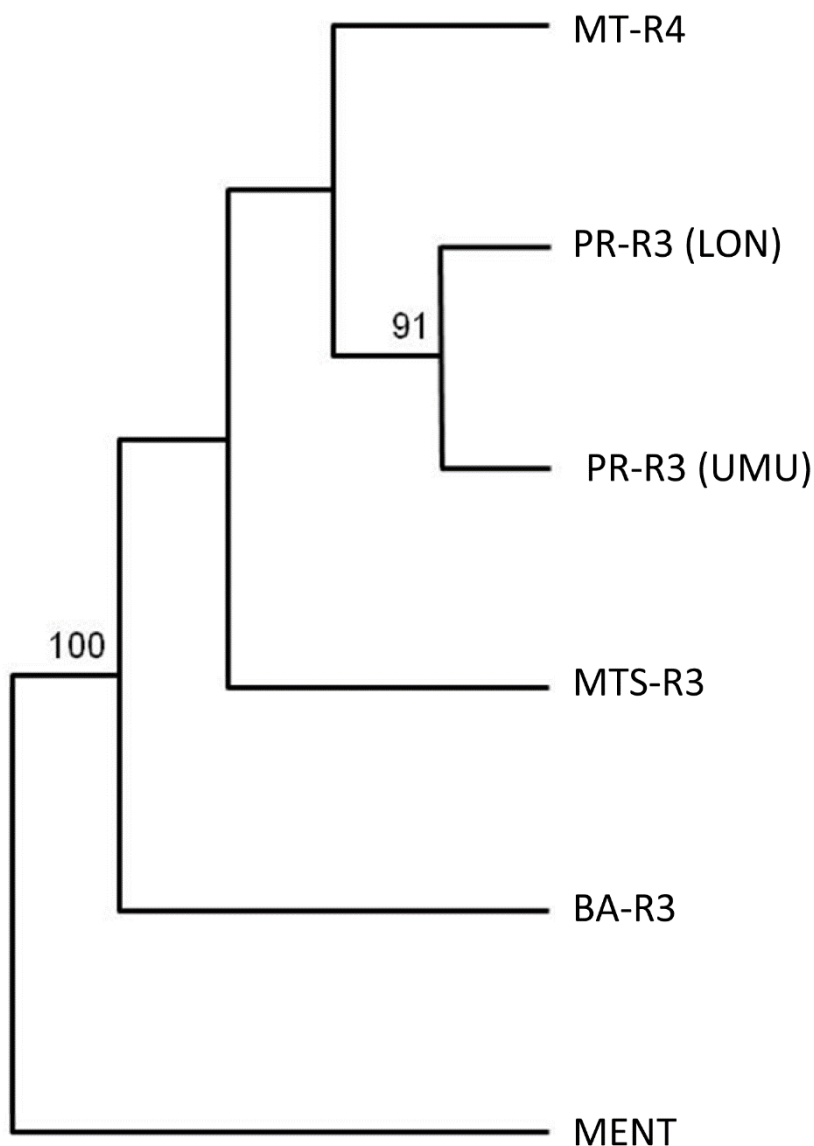
**Diversidade genética:** Todos os três marcadores foram capazes de produzir fragmentos para as populações de *Meloidogyne* testadas. Exemplos são mostrados na Figura 2. Um total de 331 fragmentos amplificados foram atribuídos às populações de *M. incognita*. O número de fragmentos variaram de 1-11/população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

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

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



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



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

**Resistência de acessos de algodão a *Meloidogyne incognita* raças 3 e 4:** a resistência foi avaliada com base em três critérios: *i*- índice de galhas, *ii*- índice de massa de ovos e *iii*- fator de reprodução. Todas as populações de nematoides testadas mostraram fatores de reprodução baixos ( $FR < 0,2$ ) para os acessos resistentes M-315 RNR (controle resistente), TX-25, CIR1348, CIR1343, Wild Mexican Jack Jones (Tabela 3). A formação de galhas e massas de ovos também foi reduzida nesses acessos de algodão (Tabela 4). Em contraste, o controle suscetível (FM966), exibiu números



altos de galhas e massas de ovos, assim como altos fatores de reprodução para todas as populações (Tabelas 3). Os acessos Clewewilt-6 e LA-887, considerados moderadamente resistentes, apresentaram valores intermediários para os índices de galhas e massas de ovos quando analisados para as populações MTS-R3, BA-R3 e PR-R3 LON (Tabelas 3). Por outro lado, eles permitiram alta formação de galhas e massas de ovos, quando analisados para as populações MT-R4 e PR-R3 UMU (Tabelas 3) e, foram considerados suscetíveis a elas.

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

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

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

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

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

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

Apesar da existência de duas raças (raças 3 e 4) e dois perfis de esterase (I1 e I2), uma baixa variabilidade genética foi observada entre as populações brasileiras de *M. incognita* em algodoeiro. Resultados semelhantes foram relatados para outras espécies de *Meloidogyne* (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Randig *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2004; Cofcewicz *et al* 2005; Santos *et al* 2012; Correa *et al.*, 2013), e pode estar relacionado com o modo de reprodução partenogenético mitótico dessas espécies (Triantaphyllou, 1985). A identificação das raças para os nematoides das galhas é importante não só para a caracterização de resistência, mas também nos programas de manejo em áreas infestadas (Fassuliotis, 1985; Ibrahim & Lewis, 1993; Castro *et al.*, 2003). No entanto, embora a determinação da raça seja importante na prática, Moens *et al.* (2009)

recomendaram a suspensão desta terminologia, já que este conceito nunca foi universalmente aceito porque mede uma parcela muito restrita da variação do potencial de variabilidade parasitária. Neste estudo, não foi observado relação entre raça, fenótipos enzimáticos (I1 e I2) e polimorfismo genético. Esses resultados sugerem que, para *M. incognita*, raças não têm um determinismo genético, o que está de acordo com observações anteriores (Carneiro & Cofcewicz, 2008). De fato, apesar dos esforços contínuos de vários grupos de pesquisa, nenhuma correlação foi encontrada entre dados isoenzimáticos/moleculares (polimorfismo infraespecífico) para diferentes espécies de *Meloidogyne* (Cenis, 1993; Baum *et al.*, 1994). Além disso, não observamos nenhuma correlação entre raça, fenótipo enzimático, diversidade genética e agressividade/virulência. Os resultados obtidos neste trabalho podem indicar uma possível relação geográfica e genética entre as populações de *M. incognita* de algodão. Resultados similares foram observados para *M. arenaria* em diferentes culturas (Carneiro *et al.*, 2008). No entanto, seria necessário confirmar esta tendência pela análise de um maior conjunto de populações desses nematoides do algodão vindo de outros continentes.

A variação fisiológica entre espécies ou populações de nematoide das galhas pode ser expressa na interação planta-nematoide em três níveis: hospedabilidade ou não, agressividade e virulência. Agressividade reflecte a capacidade de reprodução, tal como medida pelo FR, de nematoides em um hospedeiro susceptível, enquanto que a virulência é a capacidade de se reproduzir em uma planta com genes de resistência (Hussey & Janssen, 2002).

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

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

A resistência baseada em poucos genes pode impor uma pressão de seleção sobre as populações de nematoides e acelerar o surgimento de isolados virulentos (Janssen *et al.*, 1990), tal como foi observado em tomate com o gene de resistência *Mi* (Riggs & Winstead, 1959), na batata selvagem com o gene RMC2 (Janssen *et al.*, 1998) ou no café com o gene Mex-1 (Muniz *et al.*, 2009). O elevado nível de resistência a *M. incognita* encontrado na linhagem de algodão M-315 e em outras linhagens derivadas da mesma fonte Auburn 634 não tem sido transferido para variedades superiores. Essa resistência é herdada de dois genes importantes, um, possivelmente, de Clevevilt-6 e o outro de Wild México Jack Jones (McPherson *et al.*, 2004; Starr *et al.*, 2010.). Clevevilt-6 possui um gene de resistência recessivo que confere resistência moderada a *M. incognita* (Kirkpatrick & Rothrock, 2001), e acredita-se também ser a fonte de resistência em LA-

887 (Jones *et al.*, 1990). Esse mesmo alelo de resistência está presente em algumas das variedades cultivadas no Brasil, apontando para a necessidade de combinações de genes de resistência mais eficientes. Todas as populações testadas foram avirulentas a M-315, que possui um gene adicional àquele proveniente de Cleve-wilt-6. A resistência presente em Wild Mexican Jack Jones nunca foi transferida para as variedades cultivadas no Brasil. Esse acesso apresentou, curiosamente, um elevado nível de resistência a todas as populações testadas, mesmo para as mais virulentas. Os outros acessos que demonstraram altos níveis de resistência a todas as populações testadas (TX-25, CIR1348 e CIR1343) também constituem fontes interessantes de resistência e que, ao que se conhece até hoje, nunca foram utilizadas no melhoramento de variedades cultivadas. Estudos estão em curso a fim de determinar se esses alelos resistentes são diferentes de outros já descritos até hoje. A identificação e caracterização completa de novas fontes de resistência que podem ser utilizados em piramidação e/ou em rotações é uma meta importante para o controle eficaz e duradouro do nematoide das galhas do algodoeiro.

## 6. CONCLUSÕES

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

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

## REFERÊNCIAS

- ABAWI, G.S. & CHEN, J. **Concomitant pathogen and pest interactions**. In K.R. Barker, G.A. Pederson, & G.L. Windham (Eds.), Plant and nematode interactions (pp. 135–58). Wisconsin: American Society of Agronomy. 1998
- ANWAR, S.A. & MCKENRY, M.V. **Variability in reproduction of *Meloidogyne incognita* on six cultivars of cotton**. Journal of Nematology, 39, 105-110. 2007
- BAUM, T.J.; GRESSHOFF, P.M.; LEWIS, S.A. & DEAN, R.A. **Characterization and phylogenetic analysis of 4 root-knot nematode species using DNA amplification fingerprinting and automated polyacrylamide-gel electrophoresis**. Molecular Plant-Microbe Interactions, 7, 39-47. 1994
- BLOK, V.C.; PHILLIPS, M.S.; MCNICOL, J.W. & FARGETTE, M. **Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs**. Fundamental and Applied Nematology, 20, 127-133. 1997
- BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. **Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne incognita* de raízes de cafeeiros**. Fitopatologia Brasileira, 6, 553. 1981

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

CARNEIRO, R.M.D.G.; TIGANO, M.S.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A. & SARAH, J.L. **Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii.** *Nematology*, 6, 287-298. 2004

CARNEIRO, R.M.D.G. & COFCEWICZ, E. T. **The taxonomy of *Meloidogyne* spp. from coffee. In R.M. Souza (Ed.), Plant parasitic nematodes of coffee (pp. 87-122).** New York: APS Press & Springer. 2008

CARNEIRO, R.M.D.G.; DOS SANTOS, M.F.A.; ALMEIDA, M.R.A.; MOTA, F.C.; GOMES, A.C.M.M. & TIGANO, M.S. **Diversity of *Meloidogyne arenaria* using morphological, cytological and molecular approaches.** *Nematology*, 10, 819-834.2008

CASTAGNONE-SERENO, P. **GENETIC VARIABILITY OF NEMATODES: a threat to the durability of plant resistance genes.** *Euphytica*, 124, 193–199.2002

CASTAGNONE-SERENO, P.; BONGIOVANNI, M. & WAJNBERG, E. 2007. **Selection and parasite evolution: a reproductive fitness cost associated with virulence in the parthenogenetic nematode *Meloidogyne incognita*.** *Evolutionary Ecology*, 21, 259–270.2007

CASTAGNONE-SERENO, P.; PIOTTE, C.; ABAD, P.; BONGIOVANNI, M. & DALMASSO, A. **Isolation of a repeated DNA probe showing polymorphism among populations.** *Journal of Nematology*, 23, 316-320. 1991.

CASTAGNONE-SERENO P.; PIOTTE, C.; UIJTHOF, J.; ABAD, P.; WAJNBERG, E.; WANLERBERGHE-MASSUTTI, F.; ET AL. **Phylogenetics relationships between amphimictic and partenogenetic nematodes of the genus *Meloidogyne* as inferred from repetitive DNA analysis.** *Heredity*, 70, 195-204. 1993

CASTAGNONE-SERENO, P.; WANLERBERGHE-MASSUTTI, F. & LEROY, F. **Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers.** *Genome*, 37, 904-909.1994

CASTRO, J.M.C.; LIMA, R.D.D. & CARNEIRO, R.M.D.G. **Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de regiões brasileiras produtoras de soja.** *Nematologia Brasileira*, 27, 1-12.2003

CENIS, J.L. **Identification of four major *Meloidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR).** *Phytopathology*, 83, 76-80.1993

COFCEWICZ, E. T.; CARNEIRO, R. M. D. G.; RANDIG, O.; CHABRIER, C. & QUÉNÉHERVÉ, P. **Diversity of *Meloidogyne* spp. on *Musa* in Martinique, Guadeloupe and French Guiana.** *Journal of Nematology*, 37, 313-322. 2005.

CORREA, V. R., MATTOS, V. S., ALMEIDA, M. R. A., SANTOS, M. F. A., TIGANO, M. S., CASTAGNONE-SERENO, P. AND CARNEIRO, R. M. D. G. **Genetic diversity of the root-knot**

nematode *Meloidogyne ethiopica* and development of a species-specific SCAR marker for its diagnosis. *Plant Pathology*. doi: 10.1111/ppa.12108. (2013b).

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

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

FARGETTE, M.; LOLLIER, V.; PHILLIPS, M.; BLOK, V. & FRUTOS, R. **AFLP analysis of the genetic diversity of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, major agricultural pests**. *Comptes Rendus Biologies*, 328, 455–462. 2005.

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

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

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

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

JANSSEN, R., BARKER, J. & GOMMERS, F.J. **Selection of virulent and avirulent lines of *Globodera rostochiensis* for the H1 resistance gene in *Solanum tuberosum* spp. andigena CPC 1673**. *Revue de Nematologie*, 13, 265. 1990.

JANSSEN, G.J.W.; SCHOLTEN, O.E.; VAN NOREL, A. & HOOGENDOORN, J. **Selection of virulence in *Meloidogyne chitwoodi* to resistance in the wild potato *Solanum fendleri***. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 645-651. 1998.

JENSEN, J.L.; BOHONAK, A.J. & KELLEY, S.T. **Isolation by distance, web service**. *BMC Genetics*, 6, 13. v.3.23 <http://ibdws.sdsu.edu/>.2005.

JEFFERS, D.P. & ROBERTS, P.A. **Effect of planting date and host genotype on the root-knot nematode-*Fusarium* wilt disease complex of cotton**. *Phytopathology*, 83, 645–654. 1993.

JONES, J.E.; DICKSON, J.L.; AGUILLAR, W.; CALDWELL, W.D.; MORE, S.H.; HUTCHINSON, R.I., ET AL. **Stoneville LA 887: A new cotton variety**. *Louisiana Agriculture*, 33, 5. 1990.

KIRKPATRICK, T.L. & ROTHROCK, C.S. **Compendium of cotton diseases**. Minnesota: APS press. 2001.

MCCLURE, M.A.; ELLIS, K.C. & NIGH, E.L. **Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne incognita* in resistant cotton.** *Journal of Nematology*, 1, 21-26. 1974.

MCPHERSON, M.G.; JENKINS, J.N.; WATSON, C.E. & MCCARTY JR. **Inheritance of root-knot nematode resistance in M-315 RNR and M-78 RNR cotton.** *Journal of Cotton Science*, 8, 154-161. 2004.

MOENS, M.; PERRY, R.N. & STARR, J.L. ***Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites.** In R.N. Perry, M. Moens, & J.L. Starr (Eds.), *Root-knot nematodes* (pp.1-17). Wallingford: CABI International. . 2009.

MOTA, F.C.; ALVES, G.C.S.; GIBAND, M.; GOMES, A.C.M.M.; SOUSA, F.R.; MATTOS, V.S.; et al. **New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defense mechanisms.** *Plant Pathology*, doi: 10.1111/ppa.12022. (2012).

MUNIZ, M.F.S.; CAMPOS, V.P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CASTRO, J.M.C.; ALMEIDA, M.R.A. & CARNEIRO, R.M.D.G. **Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogyidae) populations from coffee and rubber tree.** *Nematology*, 10, 897-910. 2008

MUNIZ, M.F.S.; CAMPOS, V.P.; MOITA, A.W.; GONÇALVES, W.; ALMEIDA, M.R.A.; SOUSA, F.R.; ET AL. **Reaction of coffee genotypes to different populations of *Meloidogyne* spp.: detection of a naturally virulent *M. exigua* population.** *Tropical Plant Pathology*, 34, 370-378. 2009.

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

OGALLO, J.L.; GOODELL, P.B.; ECKERT, J. & ROBERTS, P.A. **Evaluation of NemX, a new cultivar of cotton with high resistance to *Meloidogyne incognita*.** *Journal of Nematology*, 29, 531-537. 1997.

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

RANDIG, O., BONGIOVANNI, M., CARNEIRO, R.M.D.G. & CASTAGNONE-SERENO, P. **Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species.** *Genome*, 45, 862-870. 2002.

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

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

ROBERTS, P.A. & I.J. THOMASON. **A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*.** In G.E. Russell (Ed.), *Geneti-*

**cal and biochemical aspects of invertebrate crop pests (pp. 269-296).** Hampshire: Intercept Andover. 1989.

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

ROBERTS, P.A.; FRATE, C.A.; MATHEWS, W.C. & OSTERLI, P.P. **Interaction of virulent *Meloidogyne incognita* and *Fusarium* wilt on resistant cowpea genotypes.** Phytopathology, 85, 1288-1295. 1995.

ROBINSON, M.R.; JENKINS, J.N. & MCCARTY JR, J.C. **Different sources of root-knot nematode resistance. In Proceeding of Beltwide Cotton Reseach Conferences. Memphis: National Cotton Council.** 1997.

ROBINSON, A.F.; BOWMAN, D.T.; COOK, C.G.; JENKINS, J.N.; JONES, J.E.; MAY, L.O.; et al. **Nematode resistance.** In T.L. Kirkpatrick, & C.S. Rothrock (Eds.), Compendium of cotton diseases (pp. 68-72). Saint Paul, MN: APS Press. 2001.

SANTOS, M.F.A.; FURLANETTO, C.; ALMEIDA, M.R.A.; CARNEIRO, M.D.G.; MOTA, F. C.; MENDES, A.C.M.; ET AL. **Biometrical, biological, biochemical and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species.** European Journal of Plant Pathology, 134, 671-684. 2012.

SEMBLAT, J.P.; WAJNBERG, E.; DALMASSO, A.; ABAD, P. & CASTAGNONE-SERENO P. **High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis.** Molecular Ecology, 7, 119–125. 1998.

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

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

STARR, J.L.; MORESCO, E.R.; SMITH, C.W.; NICHOLS, R.L.; ROBERTS, P.A. & CHEE P. **Inheritance of resistance to *Meloidogyne incognita* in primitive cotton accessions from Mexico.** Journal of Nematology, 42, 352–358. 2010.

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

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

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

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

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