

GLEINA COSTA SILVA ALVES

**HISTOLOGIA, BIOQUÍMICA E HERANÇA DA RESISTÊNCIA
DO GENÓTIPO DE ALGODOEIRO TX25 A *Meloidogyne incognita*,
RAÇA 3**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal

Orientadora:

Profa. Dra. Mara Rúbia da Rocha

Co-Orientadora:

Dra. Regina M. D. G. Carneiro

Goiânia, GO-Brasil
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

Alves, Gleina Costa Silva.

A472r Histologia, bioquímica e herança da resistência do
genótipo de algodoeiro TX25 a *Meloidogyne incognita*, raça 3 manuscrito]/
Gleina Costa Silva Alves. - 2014.
85 f.: il., tabs.

Orientadora: Prof^a. Dra. Mara Rúbia da Rocha.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Agronomia, 2014.
Bibliografia.

1. *Meloidogyne incognita* – Algodão – Resistência. 2. Nematóide
de galha – Algodão – Herança. 3. Algodão – histopatologia. I.
Título

CDU:633.511:595.132

GLEINA COSTA SILVA ALVES

HISTOLOGIA, BIOQUÍMICA E HERANÇA DA RESISTÊNCIA DO
GENÓTIPO DE ALGODOEIRO TX25 A *Meloidogyne incognita*, RAÇA

3

Tese DEFENDIDA e APROVADA em 31 de Janeiro e 2014, pela Banca Examinadora,
constituída pelos membros:

Profª Drª. Adriana Teramoto
Membro- UFG/Escola de Agronomia

Prof. Dr. Cleber Furlanetto
Membro-UnB

Prof. Dr. João Batista Duarte
Membro- UFG/Escola de Agronomia

Dr. Paulo Augusto Vianna Barroso
Membro- Embrapa/CNPA

Profª Drª Mara Rúbia da Rocha
Orientadora- UFG

Goiânia, Goiás
Brasil

Você sinto muitas saudades, não consigo te ver, mas consigo sentir, sei que está por perto, vendo tudo isso e sei que está feliz com minha conquista... Como uma singela homenagem dedico este trabalho a você, que é a pessoa com o melhor coração que eu tive a oportunidade de conhecer ...

À minha mãe Maria Abadia, pelo amor incondicional e pelos exageros diários;

À minha irmã Ludimilla Costa, pelo incentivo, sempre achando que sou a melhor agrônoma do mundo;

À minha linda sobrinha Maria, simplesmente por existir e por ter os olhinhos tão cheios de esperança, que me dá força pra continuar sempre, mesmo quando estou muito cansada;

Ao meu namorado, companheiro e melhor amigo Flávio Gonçalves de Jesus, pelo apoio incondicional em todos (sem exceção) os momentos e sempre com a mesma paciência e dedicação...

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força e sabedoria, para tornar a vida prazerosa mesmo quando difícil;

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudos para facilitar a realização desse doutorado;

À Universidade Federal de Goiás e à Escola de Agronomia, pela contribuição na minha formação e oportunidade de realização do Doutorado;

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Mara Rúbia da Rocha, por todo o ensinamento, dedicação e paciência. E por me ensinar muito mais que só nematologia, por me ensinar a ser forte e perseverante diante dos problemas;

À minha co-orientadora Dr^a Regina M. D. G. Carneiro, pelas orientações preciosas e pela disponibilização do seu laboratório para realização de parte da tese;

À Ana Cristina Gomes e Fabiane Mota, pela paciência e carinho com que me ensinaram histopatologia;

Aos pesquisadores Dr. Paulo Augusto Viana Barroso e Marc Giband, por fornecer as sementes dos genótipos avaliados e pela colaboração nos experimentos;

À Prof^a Dr^a Suzana da Costa, por ceder gentilmente o laboratório de química orgânica, pelo auxílio e orientações na metodologia dos ensaios bioquímicos. E à Gilmar Aparecida Corrêa Fortes, pelo auxílio na condução destes experimentos.

Aos professores Dr^o Pedro Henrique Ferri, Prof Dr João Batista Duarte e Prof Dr Fabrício Rodrigues, pelos esclarecimentos com a estatística, sempre muito solícitos.

Ao professor Dr Nei Peixoto pelo auxílio na interpretação dos resultados do capítulo de herança da resistência; sempre com muita boa vontade.

Ao professor Dr. Alexandre S. Guedes Coelho, por ceder o laboratório de melhoramento genético da EA-UFG, para a realização de parte dos ensaios histopatológicos.

Aos amigos do Laboratório de Nematologia da Escola de Agronomia da UFG, Adélia, Anderli, Fernando, Kássia, Leo, Renato, e a todos os estagiários e bolsistas, que passaram pelo laboratório durante esses quatro anos. Quero agradecê-lo pelo auxílio nos experimentos, pela amizade, convívio e companheirismo. Em especial quero agradecer ao Vitor Hugo, que me ajudou em toda a condução dos ensaios; sem o seu auxílio eu não

conseguiria conduzir o trabalho da forma que foi conduzida, e de bônus ainda ganhei um grande amigo;

Aos amigos, Vanessa Duarte, Miriam Marques, Felipe Arcari e José Milton, Janine Mesquita, Juliana Oliveira, Rodrigo Ferrari, Bruno Ferreira, Wanessa Vieira e Isabella, por tornarem minha passagem por Goiânia ainda mais prazerosa.

Muito obrigada a todos vocês, de coração...

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	09
GENERAL ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 A CULTURA DO ALGODÃO.....	13
2.2 MANEJO DE FITONEMATÓIDES	15
2.2.1 Métodos culturais	15
2.2.2 Métodos químicos	16
2.2.3 Métodos genéticos	17
2.3 NEMATÓIDES DAS GALHAS NA CULTURA DO ALGODOEIRO.....	21
2.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE ALGODOEIRO A <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3.....	24
3 HISTOPATOLOGIA COMPARADA DE GENÓTIPOS DE ALGODÃO RESISTENTE E SUSCETÍVEL A <i>Meloidogyne incognita</i> RAÇA 3	26
RESUMO	26
ABSTRACT	26
3.1 INTRODUÇÃO	27
3.2 MATERIAL E METODOS.....	28
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.4 CONCLUSÕES.....	34
4 COMPARAÇÃO BIOQUÍMICA ENTRE ALGODOEIRO RESISTENTE E SUSCETÍVEL A <i>Meloidogyne incognita</i> RAÇA 3	37
RESUMO	37
ABSTRACT	37
4.1 INTRODUÇÃO	38
4.2 MATERIAL E METODOS.....	39
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.4 CONCLUSÕES.....	61
5 HERANÇA DA RESISTÊNCIA GENÉTICA DE ALGODOEIRO A <i>Meloidogyne incognita</i>, raça 3	
RESUMO	62
ABSTRACT	62
5.1 INTRODUÇÃO	63
5.2 MATERIAL E METODOS.....	65
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.4 CONCLUSÕES.....	74
6 CONCLUSÕES GERAIS	75
7 REFERÊNCIAS	76

RESUMO GERAL

ALVES, G.C.S. **Histologia, bioquímica e herança da resistência do genótipo de algodoeiro TX25 a *Meloidogyne incognita*, RAÇA 3**. 2014. 85f. Tese (Doutorado em Agronomia: Produção Vegetal)-Escola de Agronomia. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2014¹.

Meloidogyne incognita, raça 3 é um dos fatores limitantes da cultura do algodoeiro, e a resistência genética é uma medida de controle das mais desejáveis por ser ambientalmente preservadora e não resultar em gastos adicionais ao produtor. O objetivo da presente pesquisa foi estudar a herança da resistência do genótipo de algodão TX 25 a *M. incognita*, raça 3, e identificar o mecanismo de ação. Foram conduzidos dois experimentos de fenotipagem em casa de vegetação, com dois parentais, um suscetível FM 966 e um resistente TX 25, retrocruzamento, geração F₁ e geração F₂, onde as plantas foram mantidas por 120 dias após serem inoculadas com o nematóide. Posteriormente avaliou-se índice de galhas, índice de massa de ovos e fator de reprodução. Experimento histopatológico foi conduzido onde as raízes de algodoeiro TX 25 e FM 966 foram avaliadas aos 2, 4, 7, 9, 11, 16, 18, 21, 23 e 29, 34 e 45 dias após a inoculação, com coloração do sistema radicular com fuscina ácida para avaliar a penetração. Foram feitos cortes nas radículas para observar as alterações causadas pela presença do nematóide no sistema radicular da cultivar suscetível e genótipo resistente. Ensaio bioquímico com os dois parentais também foram realizados. Nesse ensaio as plantas foram mantidas em casa de vegetação e inoculadas com ovos e J2 de *M. incognita*. As avaliações ocorreram aos oito, 24 e 35 dias após a inoculação. Nessas avaliações os parentais foram comparados bioquimicamente quanto aos fenóis totais, flavonóides, cromatografia líquida e ressonância magnética. O genótipo TX 25 apresenta resistência a *M. incognita* raça 3, quando incitado por esse nematóide a planta produz reação de hipersensibilidade. A geração F₂ oriundas de TX 25 e FiberMax 966 apresentou uma herança de caráter provavelmente oligogênica. O genótipo TX 25 apresenta flavonóides glicosilados e açúcares, que conferem resistência a *Meloidogyne incognita*, raça 3. O TX 25 é um material indicado como fonte de resistência para os programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: segregação, *Gossypium hirsutum*, nematoides das galhas, reação de hipersensibilidade, fenóis.

¹ Orientadora: Prof^ª Dr^ª Mara Rúbia da Rocha. EA/UFG

² Co-orientadora: Dr^a Regina M.D.G. Carneiro. Cenargen/Embrapa

GENERAL ABSTRACT

ALVES, G.C.S. **Histology, biochemistry and resistance inheritance of cotton genotype TX25 to *Meloidogyne incognita*, raça 3.** 2014. 85 f. Thesis (Doctorate in Agronomy: Plant Production)-Escola de Agronomia. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2014.

Meloidogyne incognita race 3 is a limiting factor for cotton crop, and the genetic resistance is one of the most desirable control measures for being environmentally and economically suitable. The objective of this research was to study the resistance inheritance of cotton genotype TX 25 to *M. incognita* race 3 and identify the resistance mechanism. Two experiments for phenotyping were conducted under greenhouse conditions, using two parental genotypes (susceptible FM 966 and resistant TX 25), backcross, generation F₁ and generation F₂. The plants were maintained for 120 days after inoculation (DAI). Plants were evaluated for gall index, egg mass index and reproduction factor. Histopathological study was conducted and the root systems evaluated at 2, 4, 7, 9, 11, 16, 18, 21, 23, 29, 34 and 45 DAI. The roots were stained with acid fuchsin to assess the nematode penetration. Rootlet cuts were made to observe the changes caused by the presence of the nematode in the root system of susceptible and resistant cotton cultivar. Biochemical tests were also conducted with the two parental genotypes. In this essay, the plants were kept in the greenhouse and inoculated with eggs and J2 of *M. incognita*. Assessments occurred at eight, 24 and 35 days after inoculation. The genotypes were compared biochemically as to total phenols, flavonoids, liquid chromatography and magnetic resonance imaging. The genotype TX 25 showed resistance to *M. incognita* race 3 when attacked by the nematode with the plants producing a hypersensitivity reaction. The crosses derived from TX 25 and FM 966 showed oligogenic resistance. TX 25 also shows glycosylated flavonoids and sugars that provide resistance to *Meloidogyne incognita* race 3.

Key words: segregation, *Gossypium hirsutum*, nematodes, hypersensitivity reaction, phenols.

¹ Adviser: Prof^a Dr^a Mara Rúbia da Rocha. EA/UFG

² Co-adviser: Dr^a Regina M.D.G. Carneiro. Cenargen/Embrapa

1 INTRODUÇÃO GERAL

Em níveis mundiais, há relatos de algodão desde 3.000 a.C. Quando os portugueses chegaram, os índios já usavam algodão para cobrir as pontas de suas flechas incendiárias. Desde a época de Brasil colônia até os dias atuais, a produção de algodão é marcada por muitas oscilações. O governo brasileiro, então, decidiu tomar algumas medidas com o intuito de estabilizar a produção de algodão no país. Criou-se, vinculado ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, o Serviço do Algodão, que tinha como objetivo dar assistência aos cotonicultores, estimular o melhoramento genético das variedades, proceder aos estudos de solo, clima, pragas, doenças e seus métodos de manejo, e incentivar a criação de campos experimentais (Costa & Bueno, 2004).

Em 1924, tiveram início no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), os primeiros trabalhos com melhoramento genético do algodoeiro. Em 1975, foi inaugurado, em Campina Grande-PB, o Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, hoje Embrapa Algodão. O cenário parecia propício à cotonicultura brasileira. Contudo, a entrada do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*), na década de 1980 e a redução da alíquota de importação em 1990 fizeram com que ocorresse uma redução de quase metade das áreas plantadas. Assim, em 1993, o Brasil passava de exportador para importador de algodão (Costa & Bueno, 2004). Tentando sobreviver, a cotonicultura buscou novas áreas, e chegando até a região Central do Brasil e à Chapada dos Parecis-MT. Nesse período, a Embrapa Algodão, a Fundação Mato Grosso e o Grupo Itamarati desenvolveram sementes adaptadas a essa região. Essa estratégia de mudança obteve êxito e a região Central do Brasil registrou, na safra 2012/2013, 560,9 mil hectares cultivados com algodão (Costa & Bueno, 2004). O Estado do Mato Grosso tem hoje a maior área plantada do país, contudo a maior produtividade está no Estado de Goiás, com 1576 kg.ha⁻¹, superando a média da região Centro-Oeste que é de 1523 kg.ha⁻¹ e, até mesmo, a média nacional de kg.ha⁻¹ (Conab, 2013).

Apesar das elevadas produtividades os cotonicultores sofrem com a presença de fitonematoides na lavoura e Goiás está entre os estados produtores de algodão que apresentam maiores índices desses patógenos (Iamamoto, 2003). Três espécies são consideradas nematoides-chave do algodoeiro: *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919, Chitwood, 1949.), *Rotylenchulus reniformis* (Linford & Oliveira, 1940) e

Pratylenchus brachyurus (Godfrey, 1929) Filipjev & Sch. Stekhoven, 1941 (Inomoto et al., 2006).

Como o ciclo médio do algodão é em torno de 160 dias até a colheita, podem ocorrer nesse período cinco gerações de *M. incognita* e em torno de três a quatro gerações de *P. brachyurus* e *R. reniformis*. Com populações elevadas de nematoides nas raízes e no solo, os danos à cultura são inevitáveis. Segundo Sasser & Frenkel (1987) estes nematoides são responsáveis por perdas anuais da ordem de 10,7%.

Nas estratégias de manejo de nematoides no algodoeiro, é importante observar a questão econômica e ambiental, pois os agricultores do Centro-Oeste, cada dia mais, buscam uma agricultura sustentável. Em muitos casos, os nematicidas químicos são extremamente tóxicos e, ainda, são aplicados em áreas extensas. Assim, faz-se necessário investir em cultivares resistentes, estudando novas fontes de resistência que assegurem controle eficiente e duradouro aos nematoides. O objetivo da presente pesquisa foi estudar e identificar histologicamente e bioquimicamente os mecanismos de ação da resistência do algodoeiro genótipo TX 25 a *M. incognita* raça 3, bem como a herança desta resistência em cruzamentos envolvendo este genótipo

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO ALGODÃO

O algodoeiro pertence ao gênero *Gossypium*, que é constituído por 52 espécies, sendo que apenas quatro são cultivadas: *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L. e *G. herbaceum* L. Nos dias atuais, as espécies tetraploides *G. hirsutum* e *G. barbadense* constituem as duas espécies mais cultivadas, representando aproximadamente 98% do algodão produzido no mundo. Do total da produção de fibra de algodão, 90% são provenientes de áreas com *G. hirsutum* e apenas 8% com *G. barbadense* (Carvalho, 2008).

O centro original de domesticação da espécie *G. hirsutum* provavelmente encontra-se no México (Wendel et al., 2009). Hutchinson (1951) reconheceu sete raças de *G. hirsutum*: yucatanense, punctatum, palmeri, latifolium, marie-galante, morrilli e richmondi. Atualmente, o algodão herbáceo (*G. hirsutum* raça latifolium Hutch.) é uma das dez principais espécies domesticadas. Apresenta ampla gama de utilidades como: fibra para produção de tecidos; é usado na indústria farmacêutica e de cosméticos; o óleo é utilizado para alimentação humana; produção de energia (biodiesel), e na indústria cosmética, além de farinhas para produção de ração animal (Beltrão & Azevedo, 2008).

Durante todo o ciclo biológico do algodoeiro, são necessários dias predominantemente ensolarados, com temperaturas ótimas entre 27°C e 32°C. Para uma planta de ciclo médio (160 dias), são necessários de 750 mm a 900 mm de água distribuídos durante todo o ciclo fenológico da cultura. Souza et al. (2008) dividem o ciclo do algodoeiro em cinco fases que podem variar com o ciclo da cultivar, se precoce, médio ou tardio, bem como com as condições de temperatura, umidade, fertilidade e tratamentos fitossanitários. Em geral uma cultivar de ciclo precoce bem manejada, com as condições edafoclimáticas ideais o ciclo fenológico se divide da seguinte forma:

Fase 1: Da semente à emergência, com uma variação média de quatro a dez dias em condições favoráveis;

Fase 2: Surgimento do primeiro botão floral em torno de trinta dias após a emergência;

Fase 3: Aparecimento da primeira flor, aos 45 dias após a emergência;

Fase 4: Aos noventa dias, abertura do primeiro capulho;

Fase 5: O período de colheita, quando os capulhos estão completamente abertos, começa a ocorrer por volta de 126 dias.

A produção de algodão exige solos férteis em matéria orgânica, fósforo e potássio, e com teores de nutrientes equilibrados. Também exige solos profundos e com boa capacidade de drenagem, não tolerando solos encharcados e compactados (Stewart, 2010).

O algodoeiro é acometido em todo o seu ciclo pelo ataque de insetos pragas. Dentre estes destacam-se como pragas de ocorrência geral que ocorrem no estabelecimento da cultura; pulgão (*Aphis gossypii*) e tripes (*Frankliniella schultzei*) (Santos, 2007). Há também pragas de ocorrência geral, que ocorrem principalmente no florescimento e na frutificação: o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*), complexo de lagartas curuquerê (*Alabama argillacea*), lagarta-das-maçãs (*Heliothis virescens*), lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*), além do ácaro rajado (*Tetranychus urticae*) (Santos, 2007). Ainda têm-se as pragas ocasionais e em expansão, que são de ocorrência geográfica mais restrita. É evidente que todas essas pragas causam danos à produção, contudo, as pragas que ocorrem no período reprodutivo da cultura são mais danosas, já que comprometem a produtividade e a qualidade das fibras.

Dentre as principais doenças que acometem o algodoeiro destacam-se as manchas foliares: mancha de ramulária (*Ramularia gossypii*), mancha de alternaria (*Alternaria macrospora*), mancha de mirotécio (*Myrothecium roridum*), mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Malvacearum*) e ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*), murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*) e viroses. Além dessas doenças destacam-se também os fitonematóides: *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus brachyurus* e *Rotylenchulus reniformis* (Inomoto et al, 2006).

Todos esses problemas fitossanitários, associados à elevada exigência nutricional, elevam os custos de produção do algodoeiro. A forma mais racional e eficiente para manejar essas pragas e doenças seria portanto o uso do manejo integrado, associando

sempre o uso de cultivares resistentes ou moderadamente resistentes às demais estratégias de controle. Contudo, nem sempre é possível encontrar no mercado cultivares que atendam a essas exigências e que, ainda, tenham boas características agronômicas.

2.2 MANEJO DE FITONEMATOIDES EM ALGODÃO

2.2.1 Métodos culturais

Em áreas com mais de uma espécie de fitonematoide, a rotação de culturas, que dentre as medidas culturais é a mais utilizada pelos produtores, fica mais difícil de ser usada, pois a gama de plantas anuais não hospedeiras aos nematoides é restrita. Nesse caso, o objetivo é diminuir primeiramente a população mais agressiva ao algodoeiro. Uma opção para área com *M. incognita* é a cultura do amendoim. Essa prática é eficiente e muito utilizada nos Estados Unidos (Johnson et al., 2000). No Brasil, esta estratégia ainda é pouco usada (Asmus et al., 2011).

Outra medida que pode ser adotada no manejo do patógeno é o uso de adubos verdes. Dentre estes, têm-se como não hospedeiras de *M. incognita*, a *Crotalaria spectabilis*, *C. breviflora* e a mucuna preta (*Stizolobium aterrimum*). Para *Pratylenchus brachyurus* as estratégias de manejo são ainda mais restritas. O que se tem indicado para a rotação ou sucessão de culturas são *C. spectabilis* e *C. breviflora*. Além das crotalárias já citadas, para o manejo de *Rotylenchulus reniformis*, recomenda-se *C. juncea*, *C. paulinea*, *C. striata*, *C. grantiana*, *C. mucronata*, *C. retusa* e *C. lanceolata*, além de outras culturas anuais, como milheto ADR 300 e algumas cultivares de soja (Asmus, 2001)

Outra prática menos expressiva no Brasil, mas que apresenta bons resultados é o alqueive do solo por ao menos três ou quatro meses. Assim, sem a presença de hospedeiro, os nematoides ficam sem alimentos por determinado período e morrem por inanição. Essa prática pode ser realizada de forma localizada, já que os nematoides têm mobilidade restrita e apresentam-se agregados na área, formando as reboleiras. Outras medidas incluem a diversificação da atividade agrícola, evitando-se a monocultura; a integração lavoura pecuária, e o preparo do solo que deve ser realizado de forma localizada. Essa prática expõe os nematoides à radiação solar, levando-os à morte. Entretanto, vale ressaltar que se a aração for feita em área total essa prática tem efeito contrário, pois os nematoides podem ser disseminados para toda a área (Suassuna et al.,

2006). Outra medida importante no manejo de nematoides é o plantio direto, pois, além do solo ficar sempre coberto e protegido da erosão, ocorre menor movimentação, reduzindo sua disseminação.

2.2.2 Métodos químicos

Embora não seja o principal método de controle de nematoides, o controle químico tem sido uma das alternativas em algumas culturas. No Brasil, o controle químico de nematoides é feito basicamente com produtos não fumigantes de translocação sistêmica, do grupo químico dos carbamatos e organofosforado. São aplicados no sulco de plantio, e podem ser líquidos ou granulados (Asmus & Inomoto, 2007). Os carbamatos ou organofosforados agem no sistema nervoso do nematoide, mais precisamente na enzima acetilcolinesterase, causando hiper excitação dos nematoides, levando-os à morte (Guedes et al., 2008).

Nos Estados Unidos, em doses recomendadas, o uso de aldicarb pode elevar a produtividade da fibra do algodão na base de 1:10; ou seja, a cada kg de produto comercial aplicado ocorre aumento de 10 kg de fibra. No Brasil, doses semelhantes às recomendadas nos Estados Unidos já foram associadas a aumentos de produtividade da ordem de 225 a 375 kg de algodão em caroço (Suassuna et al., 2006). Esse produto, entretanto, não é mais comercializado no Brasil para a cultura do algodão.

Os nematicidas químicos registrados hoje no Ministério da Agricultura Pecuária Abastecimento e Desenvolvimento são seis produtos, com cinco ingredientes ativos diferentes. Um produto à base de abamectina, um com imidacloprido mais tiodicarbe, dois produtos registrados à base de carbofurano, um com fenamifós e outro registrado é cadusafós (MAPA, 2013). Antes da aplicação é importante observar o tipo de solo e a umidade, pois esses fatores podem alterar os resultados. Deve-se observar também a relação custo benefício, já que a aplicação desses produtos tem elevado valor por hectare (Jesus Junior et al., 2008).

Uma alternativa de controle químico, que tem sido foco de estudos recentes, é o uso de produtos para tratamento de sementes. Kubo et al. (2012), avaliando o efeito de vários nematicidas químicos no tratamento de sementes, observaram que aos 44 dias após a aplicação a população de *R. reniformis* foi menor nos tratamentos com tiodicarbe e thiodicrab + imidacloprid, quando comparados à testemunha.

Amorim et al. (2009) observaram que a combinação de abamectina + azoxystrobin, metalaxyl-M e fludioxil + thiametoxam, no tratamento de sementes, resultou em menor fator de reprodução para *M. incognita*, em comparação à testemunha. A abamectina é registrada no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para tratamento de sementes de algodão, no controle de *M. incognita* e *P. brachyurus* (MAPA, 2011). Atua no ácido gama aminobutírico (GABA), que, por sua vez, altera a abertura dos canais de cloro, favorecendo maior passagem desse elemento na cutícula do nematoide. Assim, transmite impulsos nervosos repetitivos, causando hiperexcitação (Galo et al., 2002) e morte do nematoide

No Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, além da abamectina, tem-se registrado para tratamento de sementes para controle de *M. incognita* em algodoeiro o imidacloprid (neonicotinoide) + tiodicarbe (metilcarbamato de oxima), produto classificado como altamente tóxico. O carbofurano é medianamente tóxico, e fenamifós (organofosforado), altamente tóxico. Mais recentemente, registrou-se um cadusafós, também organofosforado, altamente tóxico (MAPA, 2012).

O manejo de fitonematoides com tratamento de semente permite menor quantidade de produto usado, o que afeta menos o meio ambiente e torna-se uma prática economicamente mais viável, principalmente quando comparada com os nematicidas aplicados no sulco de plantio. Segundo Mentem & Moraes (2010), o tratamento de semente corresponde de 0,5-1,0% do custo de produção para as culturas em geral.

2.2.3 Métodos genéticos

O caráter com resistência a determinada doença de planta é controlado geneticamente. Em alguns casos o fator de resistência é governado por um único gene, em outros pode ser controlado por poucos ou muitos genes. Logo, se uma cultivar ou determinada variedade não possui essa característica de resistência, deve-se procurar por métodos do melhoramento genético que consigam transferir esses genes de resistência, mantendo as características agronômicas desejáveis.

Conhece-se como resistência horizontal aquela conferida por vários genes, portanto, acredita-se ser mais durável no campo. A resistência horizontal é caracterizada por diferenças quantitativas. Reduz o desenvolvimento da infecção e a taxa de disseminação da doença. Para se conseguir essa resistência é necessário identificar as

fontes de resistência e incorporar os respectivos genes de resistência. Para avaliar a resistência horizontal avaliam-se os componentes da resistência tais como severidade, área abaixo da curva de progresso da doença, período de incubação, período de latência, período de infecção, frequência de infecção, número de lesões e taxa de expansão da doença (Pascholati, 2011).

A resistência monogênica, controlada por um gene, é uma reação qualitativa, chamada de resistência vertical. Ou seja, o gene de virulência do patógeno tem um gene complementar de resistência no hospedeiro, conforme a teoria gene-a-gene (Flor, 1942). É uma resistência completa, não é afetada pelo ambiente. Contudo, por ser conferida por um par de genes é mais fácil de ser suplantada, sendo uma desvantagem. Por outro lado, por ser conferida por um gene, é mais fácil de ser transferida de uma planta a outra, logo, é a resistência mais usada nos programas de melhoramento (Pascholati, 2011).

Na natureza resistência é regra, e doença é exceção (Vanderplank, 1963). A efetividade da resistência depende de seus mecanismos após o contato do patógeno potencial com o hospedeiro. Esses mecanismos de resistência podem ser estruturais na planta, ou podem ser de ordem bioquímica. Além disso, podem existir na planta mesmo antes da interação desta com o patógeno (pré-formados), ou só se manifestar após a infecção do patógeno (pós-formados) (Pascholati, 2011).

Dentre os fatores de resistência estruturais pré-formados, destaca-se a espessura da parede celular, que influencia diretamente no primeiro estágio do ciclo de infecção, que é a penetração do patógeno na planta hospedeira (Pascholati, 2011). Os juvenis de segundo estágio do gênero *Meloidogyne* são a forma infectiva desse nematoide, que migram no solo logo após a eclosão e penetram em radículas de plantas suscetíveis. Essa penetração é, a princípio, uma penetração mecânica, que pode ser influenciada diretamente pela espessura da parede celular, favorecendo ou não a infecção do nematoide nas raízes do algodoeiro.

Segundo Pascholati (2011), outro fator estrutural pré-formado é a cutícula, que pode funcionar como barreira física devido à sua espessura, podendo dificultar a penetração do patógeno. Pode ainda representar uma barreira tóxica aos nematóides, pois, substâncias para fungos já foram isoladas substâncias nocivas de plantas como macieira, algodoeiro e fumo. Também os tricomas podem estar diretamente associados à resistência devido, principalmente, à capacidade de secretar substâncias tóxicas aos fitopatógenos, tais como terpenos, fenóis, alcalóides e ácido málico.

Os fatores estruturais pós-formados são agregação citoplasmática, halos, papilas, lignificação e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina. Todos estes mecanismos agem de forma semelhante, acumulando-se no local de infecção do patógeno. Já a formação da camada de abscisão, que também é um mecanismo de resistência estrutural pós formado, é caracterizada pela dissolução da lamela média, por enzimas celulolíticas e pectinolíticas, podendo levar à queda do tecido onde se o patógeno está localizado (Pascholati, 2011).

A camada de cortiça é outro mecanismo de resistência estrutural pós-formado em que o felogênio ou câmbio cortical dão origem às células corticosas, que impede a invasão de patógenos biotróficos, além de interromper o fluxo de água e nutrientes. Esse mecanismo age diretamente no ponto de infecção do patógeno (Pascholati, 2011). No caso de *Meloidogyne* essa camada dificulta ainda mais o seu estabelecimento na planta hospedeira, pois, uma vez estabelecido o sítio de alimentação este nematoide perde sua mobilidade, tornando-se sedentário. Quando ocorre a formação dessas células corticosas o nematoide perde seu sítio de alimentação. Como não tem mais a passagem de água e nutrientes para as células nutridoras do nematoide e esse não consegue se movimentar para outra parte da raiz que esteja saudável; então o nematoide morre por inanição.

Dentre os compostos bioquímicos pré-formados merece destaque, para os nematoides, o ácido clorogênico. Este ácido está presente na planta e, quando o nematoide inicia o seu processo de alimentação, ao ingerir o ácido, este parece agir diretamente no sistema nervoso do fitonematoide, prolongando sua fase juvenil (Pegard et al., 2005), diminui o número de gerações do patógeno ao longo do desenvolvimento da cultura e, conseqüentemente, o número de nematoides no solo. O ácido clorogênico diminui habilidades dos juvenis de segundo estágio em se movimentar no solo e encontrar a planta hospedeira; logo, morrem por inanição (Huang & Rhode, 1973).

As fitoalexinas e a reação de hipersensibilidade são mecanismos de resistência pós-formados de natureza bioquímica. Estão entre os mais estudados para fitonematoides. As fitoalexinas são substâncias com baixa massa molecular, formada em resposta à penetração de nematoide. São, em sua maioria, compostos que cruzam a membrana plasmática e atuam dentro da célula; pertencem a diferentes classes químicas, como fenóis do tipo flavonóides, que conferem maior toxicidade aos nematoides (Huang, 1985). Como as fitoalexinas pertencem a classes químicas distintas o seu mecanismo de ação também é variável.

A hipersensibilidade é uma reação de resposta da planta ao ataque de patógenos. É uma reação de resistência local, que provoca aumento de agentes oxidativos no interior da célula, ocorrendo perda de potássio e ganho de hidrogênio, levando à morte celular, induzindo à síntese de fitoalexinas e de proteínas de defesa (Dias & Rangel, 2007). A reação de hipersensibilidade (HR) provoca a morte repentina de um número limitado de células do hospedeiro, circundando o sítio de alimentação do nematoide (*M. incognita*). A resposta ocorre em função do reconhecimento da infecção por parte do hospedeiro, como consequência da incompatibilidade entre a planta e o patógeno (Pascholati, 2011). É um dos mecanismos de defesa mais importantes para as plantas. Como *Meloidogyne* tem hábito de parasitismo sedentário, se as células ao redor do seu sítio de alimentação forem destruídas, o nematoide fica sem se alimentar e, conseqüentemente, morre.

Dentre os compostos bioquímicos pós-formados, o gossipol e terpenoides aldeídos são compostos que ocorrem naturalmente em plantas de algodão da espécie *Gossypium hirsutum*. Estes são relatados como compostos tóxicos a vários patógenos. Khoshkhoo et al. (1994) observaram que genótipos com maior concentração de gossipol e terpenoides aldeídos apresentaram menores número de ovos de *Meloidogyne* sp. e a produção desses compostos químicos é aumentada após a penetração do nematoide.

Asmus & Inomoto (2007), no contexto da nematologia, definem resistência como a capacidade de a planta limitar a reprodução do nematoide. Contudo, quando se fala de plantas cultivadas, ou mais especificamente, de cultivares comerciais de algodão, as fontes de resistência são escassas. Basicamente todo o material resistente no mundo é originário de apenas três fontes: Acala NemX, primeira fonte de resistência, moderadamente resistente; Clewewilt 6, segunda fonte de resistência; e por fim Auburn 623 (cruzamento entre Clewewilt 6 x Will Jack Jones). A cultivar 'Auburn 56' originou-se do cruzamento entre 'Cook 307-6' e 'Coker 100-Wilt' (Bird, 1973). Foi um material interessante porque combinou resistência ao nematoide-das-galhas, a murcha-de-fusário e boas características agrônômicas, o que lhe rendeu boa aceitação comercial por mais de vinte anos (Asmus & Inomoto, 2007).

No Brasil têm-se algumas cultivares como CD 405, IAC 24, BRS Aroeira, BRS Cedro e BRS Sucupira, que são moderadamente resistentes, mas, apresentam baixa produtividade (Asmus et al., 2011). Estudo realizado com genótipos do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) mostrou que apenas o IAC 96/414 foi classificado como

resistente ao complexo *M. incognita* e fusário. Este material é um híbrido do IAC 20, que, por sua vez é originário do Auburn 56. Entretanto, não houve elucidação da causa da resistência (Carneiro et al., 2005). As cultivares Acala NemX e Stoneville LA 887 são consideradas moderadamente resistentes (Suassuna et al., 2006) e apresentam redução de cerca de 80% a 95% da população de *M. incognita* na área; contudo, são materiais com baixo potencial agrônomico e não são encontrados no mercado nacional (Asmus & Inomoto, 2008).

2.3 NEMATÓIDE DE GALHAS NA CULTURA DO ALGODOEIRO

Os nematoides das galhas, gênero *Meloidogyne*, pertencem à ordem Tylenchida, subordem Tylenchina, superfamília Tylenchoidea, família Heteroderidae (Ferraz & Monteiro, 2011). O primeiro relato de nematoide das galhas no mundo foi feito por Berkeley, em 1855, que observou os danos causados em plantas de pepino (Berkeley, 1855). Até 1949, dentro do gênero *Meloidogyne*, os nematoides das galhas eram todos considerados como pertencentes à mesma espécie, *Heterodera radicola*. Entretanto, o Dr. Emílio Goeldi, em 1887, já havia publicado um artigo em que descreveu *M. exigua*, a espécie-tipo do gênero, atacando os cafezais na província do Rio de Janeiro (Goeldi, 1892). Esse relatório ficou esquecido por 62 anos nos arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro. Foi, então, redescoberto só em 1949. Desde essa época até o presente foram descritas aproximadamente cem espécies de *Meloidogyne*, e tanto no Brasil como nos Estados Unidos, a raça 3 é a mais importante economicamente (Carneiro et al., 2005).

O nome *Meloidogyne* é de origem grega, significando “fêmea com formato de melão ou abóbora”. As fêmeas adultas dessa espécie localizam-se no interior da raiz, são globosas, em formato piriforme, brilhantes e brancacentas. Cada fêmea deposita cerca de quatrocentos a quinhentos ovos, sendo estes depositados em uma massa gelatinosa, a ooteca, que começa a ser expelida pelo ânus antes da oviposição, o que prossegue os ovos durante a postura (Tihohod, 1993).

O ciclo biológico de *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood (1949) inicia no ovo, onde se forma o juvenil de primeiro estágio (J1). A primeira ecdise ocorre ainda dentro do ovo, dando origem a forma J2. Estes abandonam a ooteca e migram em movimento serpentiforme para o solo, em busca de alimento e são atraídos por exsudatos radiculares. Um juvenil de segundo estágio apresenta formato vermiforme e possui um frágil estilete labial. É neste estágio que esse o gênero é infectivo e penetra a raiz tornando-

se sedentários. Os juvenis de segundo estágio ao introduzirem o estilete para se alimentarem, liberam secreções de suas glândulas esofagianas. Essas substâncias causam aumento no número e tamanho das células, ocasionando, respectivamente, hiperplasia e hipertrofia celular, formando, então, as células gigantes ou nutridoras. Assim, estabelece-se o sítio de alimentação e, até a quarta ecdise, esses juvenis ficam em uma espécie de membrana. Só após ocorrer a diferenciação sexual entre macho e fêmea, essa cutícula se rompe e o macho é liberado da raiz. Este não se alimenta, logo não causa danos às plantas. Se na diferenciação sexual o juvenil resultar em fêmea esta continua na raiz, alimentando-se até completar seu ciclo. As condições climáticas influenciam diretamente na reversão sexual. Sob condições de estresse, os juvenis femininos sofrem reversão e transformam-se em machos (Ferraz & Monteiro, 2011)

Na presença de macho, a reprodução pode ser sexual, contudo como os machos são raros a reprodução se dá por partenogênese. Segundo Lordello (1992), o tempo desde a penetração do juvenil na raiz, até a primeira oviposição depende de fatores como umidade, quantidade de potássio e temperatura, sendo que a temperatura ótima para esta espécie está entre 25°C a 30°C. Com diminuição da temperatura, o número de dias para a penetração aumenta. Com temperatura acima de 40°C e abaixo de 5°C os juvenis cessam suas atividades vitais e morrem.

Rezende et al. (2011) classificam os sintomas de *M. incognita* em diretos e reflexos. O sintoma direto é a formação de galhas nas raízes que são engrossamento observado tanto na raiz principal como nas secundárias. Estas galhas são oriundas da hiperplasia e hipertrofia das células vizinhas ao sítio de infecção/alimentação estabelecido pelas fêmeas. As plantas com alta infestação de *M. incognita* apresentam poucas radículas, o que dificulta a absorção e a consequente translocação de água e nutrientes para a parte aérea, causando sintomas muito semelhantes ao de deficiência nutricional, identificado como sintomas reflexos. As folhas apresentam variação de cor entre o verde-escuro e um verde mais amarelado, caracterizada como “folha carijó do algodoeiro”. Nos plantios os sintomas na parte aérea normalmente ocorrem em reboleira, devido à baixa mobilidade dos nematoides no solo.

A severidade dos sintomas pode agravar-se com a elevada densidade populacional de nematoides no solo e/ou com a associação destes com outros patógenos. Este é o caso da associação com *Fusarium oxysporium*, responsável por causar murcha severa. Ao se alimentarem, os nematoides causam ferimentos na raiz da planta, os quais

vão servir como porta de entrada para o fungo, o que dificulta e onera ainda mais o manejo da cultura (Machado & Cassetari Neto, 2004).

Algumas espécies de *Meloidogyne* só podem ser separadas umas das outras por suas preferências de hospedeiro. Essas preferências são denominadas raças biológicas ou fisiológicas. Eisenback (1983) relata que *M. incognita* apresenta quatro raças fisiológicas. Todas as raças reproduzem-se em tomate cultivar Rugter; melancia cultivar Florunner e pimenta cultivar C. Wonder; porém, suas repostas à cultivar NC 95 de fumo e à cultivar de algodão Deltapine 16 variam com a raça, como mostrado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 Hospedeiros diferenciais usados na identificação de espécies e raças de *Meloidogyne incognita*, sendo (+) hospedeiro favorável e (-) hospedeiro desfavorável.

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

Fonte: Taylor & Sasser (1978)

As raças 3 e 4 que parasitam o algodoeiro, estão presentes em praticamente todas as regiões produtoras do mundo, principalmente nas áreas com solo de textura arenosa e de baixa fertilidade (Starr & Page, 1993). Segundo Asmus (2004), apenas a presença desse nematoide no solo já é suficiente para causar prejuízos à cultura.

2.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE ALGODOEIRO A *Meloidogyne incognita*

Os genótipos conhecidos de algodoeiro resistentes a *M. incognita* basicamente são Clewilt 6, Wild Mexico, Auburn 623, Alburn 634, e M-315. Cada um destes genótipos pode apresentar diferentes mecanismos de resistência. Sabe-se que algumas cultivares de algodoeiro são capazes de produzir uma proteína chamada MIC 3 (*Meloidogyne induced cotton 3*) que confere resistência ao *M. incognita*. Essa proteína foi isolada do acesso AY072782 (Zhang et al., 2002). Sabe-se que esta característica está relacionada ao gene de efeito maior no cromossomo 11, o qual causa redução no número de galhas nas raízes (Gutiérrez et al., 2010). Alguns estudos também evidenciam que compostos fenólicos produzidos pelo algodoeiro são responsáveis pela resistência (Narayana & Reddy, 1980).

Segundo Suassuna et al. (2006), o genótipo M-315 é altamente resistente a *M. incognita*, pode reduzir em 90% a 95% a multiplicação do nematoide, em comparação a genótipos suscetíveis. Essa capacidade de redução é conferida por dois pares de genes, um dominante (Mi_1) e outro aditivo (Mi_2); assim, esta resistência pode ser transferida para outros genótipos, resultando em plantas altamente resistentes (Mi_1 __, Mi_2 Mi_2), resistentes (Mi_1 __, Mi_2 mi_2), moderadamente resistentes (Mi_1 __, mi_2 mi_2 ou mi_1 mi_1 , Mi_2 Mi_2) ou suscetíveis (mi_1 mi_1 , Mi_2 mi_2 ou mi_1 mi_1 , mi_2 mi_2).

O mecanismo de resistência moderada de Acala NemX é conferido apenas pelo par de alelos aditivos (mi_1 mi_1 , Mi_2 Mi_2), o que permite através de melhoramento genético obter cultivares muito mais resistentes. Sob altas infestações de *M. incognita*, mesmo as cultivares de algodão resistentes ou moderadamente resistentes sofrem perdas de produção. Zhou & Starr (2003) estimaram essas perdas em 7% a 20% nas cultivares moderadamente resistentes Acala NemX e Stoneville LA887, em comparação a 20% e 29% na cultivar suscetível Paymaster H26. Logo, a resistência varietal não pode, por ora, ser utilizada como medida única de controle para o nematoide das galhas, visto que seu uso contínuo por longos períodos pode resultar na seleção de populações de *M. incognita* que suplantem esta resistência (Suassuna et al., 2006).

Jenkins et al. (1995), avaliando três genótipos de algodão, em relação a hospedabilidade de *M. incognita*, observaram que a penetração dos juvenis de segundo estágio não diferiu nos materiais moderadamente resistentes e suscetíveis. Entretanto, observaram que mesmo conseguindo penetrar nas radículas do algodoeiro, o nematoide não conseguiu se desenvolver no genótipo resistente, M315. Poucos indivíduos conseguiram chegar à idade adulta e produzir ovos e massa de ovos. Esse resultado mostra que o mecanismo de resistência influencia diretamente na fecundidade das fêmeas. Greech et al. (1995), trabalhando com os mesmos genótipos, observaram que, enquanto em M-8 e M-18 os nematoides iniciaram a produção de ovos aos 18 dias após a inoculação (DAI), em M315 (resistente) a produção de ovos ocorreu aos 22 DAI, isto é, mais tardiamente.

3 HISTOPATOLOGIA COMPARADA ENTRE GENÓTIPOS DE ALGODÃO RESISTENTE E SUSCETÍVEL A *Meloidogyne incognita* RAÇA 3.

RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo estudar o mecanismo de resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3 em dois genótipos de *Gossypium hirsutum*: 'FiberMax 966', suscetível e 'TX 25', genótipo selvagem resistente. O experimento foi conduzido em casa de vegetação e as avaliações foram realizadas retirando-se uma planta resistente e uma suscetível em cada avaliação, aos 2, 4, 7, 9, 11, 16, 18, 21, 23 e 29, 34 e 45 dias após a inoculação (DAI). Nas raízes foram feitos cortes histológicos em ultramicrotomo. O restante das raízes foi colorido com fucsina ácida, observado e fotografado ao microscópio óptico. O genótipo resistente retardou o desenvolvimento do nematoide, sendo observadas fêmeas adultas somente aos 45 DAI. O mecanismo de defesa foi tardio, dos 14-18 DAI. Aos 14 DAI observaram-se células gigantes, com citoplasma em processo de degeneração, ao lado de juvenis de segundo estágio alimentados, com visíveis traços de morte celular e reação de hipersensibilidade ao redor do corpo. Aos 18 DAI, as células gigantes já não apresentavam conteúdo citoplasmático e aos 28 DAI observaram-se J2 alimentados, aprisionados em tecido degenerado e com compostos fenólicos visíveis no intestino. Na cultivar suscetível o desenvolvimento do nematoide foi normal com células gigantes bem formadas e espessamento de membrana, ao lado de fêmeas com ovários formados aos 28 DAI.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum*, nematoides de galhas, células gigantes, TX 25, FiberMax 966.

ABSTRACT

COMPARATIVE HISTOPATHOLOGY BETWEEN COTTON GENOTYPES RESISTANT AND SUSCEPTIBLE TO *Meloidogyne incognita* RACE 3.

This research aimed to study the mechanism of resistance to *M. incognita* race 3 in two genotypes of *Gossypium hirsutum*: 'FiberMax 966', susceptible, and 'TX 25', wild genotype resistant. Experiment was conducted under greenhouse conditions. The evaluation was made by collecting resistant and susceptible plants in each evaluation time at 2, 4, 7, 9, 11, 16, 18, 21, 23, 29, 34 and 45 days after inoculation (DAI). Histological cuts were made in roots using ultramicrotome. The remainder of the root system was stained with acid fuchsin,

and observed and photographed under optical microscope. The resistant genotype slowed the development of the nematode, with adult females were observed only at 45 DAI. The defense mechanism was late from 14 to 18 DAI. At 14 DAI giant cells with cytoplasmic degeneration process beside J2 fed with visible traces of cell death and hypersensitive reaction around the body were observed. At 18 DAI, the giant cells showed no cytoplasmic contents and at 28 DAI J2 fed, trapped in degenerate tissue with phenolics in the intestines were observed. Development was normal, in susceptible cultivar. At 28 DAI plants showed giant cells with well-formed membrane thickening beside females with ovaries formed.

Key words: *Gossypium hirsutum*, root-knot nematodes, giant cells, TX 25, FiberMax 966

3.1 INTRODUÇÃO

Na cotonicultura brasileira as principais espécies de fitonematoídeos são *Meloidogyne incognita*, (Raças 3 e 4), *Rotylenchulus reniformis* e *Pratylenchus brachyurus* (Soares & Santos, 2005). Segundo Starr & Smith (1993), *M. incognita* é a espécie mais distribuída geograficamente. *M. incognita* raça 3 é relatado como o nematoídeo mais importante para o algodoeiro, tanto no Brasil como nos Estados Unidos.

Os juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* penetram no sistema radicular da planta e iniciam seu processo de infecção, estabelecendo o sítio de alimentação. Nesse processo de alimentação o nematóide injeta toxinas esofagianas na planta que ocasionam a hipertrofia e a hiperplasia das células; ou seja, as células da raiz da planta aumentam em número e em tamanho, formando as células gigantes (Sijmons et al., 1994). O sistema radicular é comprometido, tanto pela redução de volume como pela formação de galhas, comprometendo a absorção de água e nutrientes. Devido à desorganização celular que ocorre, as perdas podem chegar a 10,7% da produção de algodão (Sasser & Freckman, 1987).

Para manejar esse fitonematoídeo em áreas de algodão, uma das alternativas mais viável é o controle cultural, que muitas vezes, é difícil de ser aplicado devido à polifagia da espécie *M. incognita*. Outra alternativa é o uso de cultivares resistentes que, segundo Roberts (2002), tende a reduzir a população do nematoídeo no solo a níveis não danosos à cultura. Contudo, a oferta de material genético resistente no mercado ainda é muito restrita. As cultivares de algodão resistentes a *M. incognita* que se encontram no mercado são todas oriundas das mesmas fontes de resistência: Acala NemX, Clewewilt 6 e Auburn 623. A cultivar 'Auburn 56' originou-se do cruzamento entre 'Cook 307-6' e 'Coker

100-Wilt' (Bird, 1973), foi um material interessante porque combinou resistência ao nematoide-das-galhas, à murcha-de-fusário e boas características agrônômicas, o que lhe rendeu boa aceitação comercial por mais de vinte anos (Asmus & Inomoto, 2007).

Para o Brasil o Ina década de 1990 a cultivar IAC 20, material originário do cruzamento entre Alburn 56 e HG 11-9-75. Posteriormente, o IAC lançou 96/414, IAC 22 e IAC 23 ambos originários de IAC 20, logo todos originados da mesma fonte de resistência e já em desuso no mercado. Disso infere-se que se as fontes de resistência são escassas, os mecanismos de resistência são os mesmos, logo são fáceis de serem suplantados (Carneiro et al., 2005). Outra fonte de resistência é o genótipo TX 25 (*Gossypium hirsutum* raça *punctatum*). Esta é uma planta selvagem, coletada no Texas, Estados Unidos em maio de 2010 (GRIN, 2014).

Para os nematoides sedentários, o mecanismo de resistência mais comum é a reação de hipersensibilidade. Por matar as células em volta do sítio de alimentação do nematoide esse mecanismo cessa a alimentação do nematoide levando-o à morte (Schmitt & Noel, 1984). Contudo, essa reação pode ser expressa em momentos diferentes durante a infecção. Pode ser logo no início do processo infectivo, ou após o nematóide já ter estabelecido seu sítio de alimentação e ter iniciado seu desenvolvimento, caracterizando uma resistência tardia.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar uma possível resistência do genótipo TX 25 ao *M. incognita*. Esta resistência vai ser avaliada por meio de coloração de raízes e de estudos histopatológicos, observando a penetração e o desenvolvimento do nematoide em comparação à cultivar FiberMax 966.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O genótipo TX 25 foi escolhido por ter apresentado em estudos anteriores, baixo fator de reprodução para *M. incognita* raça 3. Como padrão de suscetibilidade foi escolhida a cultivar FiberMax 966. As sementes foram obtidas do banco de germoplasma da Embrapa Algodão.

A semeadura foi realizada em sacos plásticos com capacidade para 1,0 L, contendo areia autoclavada. Estes sacos foram mantidos sobre bancadas em casa de vegetação. A semeadura foi feita de forma escalonada, para que no momento da inoculação tivesse o número necessário de juvenis de segundo estágio. Foram mantidas doze plantas do genótipo resistente e doze do suscetível.

Para obtenção do inóculo uma raiz de tomate (*Solanum lycopersicum*) do grupo Santa Cruz, cultivar Santa Clara, foi cedida pelo laboratório de nematologia do Cenargen para iniciar a multiplicação do *M. incognita* raça 3. Inicialmente, a população foi oriunda de área de algodão naturalmente infestada em Londrina, Paraná. A identificação da espécie e da raça foi feita na Embrapa Recursos Genéticos – Cenargem. A espécie foi identificada por meio do fenótipo das esterases (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, de acordo com o método proposto por Hartman & Sasser (1985). Na Universidade Federal de Goiás, esse inóculo inicial foi mantido em casa de vegetação por três meses, também em tomateiro Santa Cruz, cultivar Kada, em vasos com substrato composto por mistura de solo, areia e substrato comercial (Germinar[®]), na proporção de 1:1:1. O substrato foi previamente autoclavado a 120°C, e pressão de 1 kgf por vinte minutos. Ao final de noventa dias, retirou-se a parte aérea das plantas e as raízes foram cortadas e trituradas em liquidificador com água e hipoclorito de sódio (NaOCl a 0,5%) por um minuto (Hussey & Barker, 1973). A concentração de ovos foi determinada por meio de contagem em microscópio óptico com aumento de 100x, com auxílio de câmara de Peters.

A suspensão contendo os ovos de nematoides foi incubada em câmara de eclosão (Cliff & Hirschmann, 1985). Foi montada câmara de eclosão, constituída por um recipiente contendo água, no qual havia uma peneira mergulhada que servia de suporte para o papel facial; este também ficava em contato com a água. A suspensão de ovos foi vertida sobre o papel no qual por gravidade, os juvenis de segundo estágio, ao eclodirem passavam pelo papel, pela peneira e ficavam depositados no fundo do recipiente. Esta suspensão foi coletada com pipeta de Pasteur, novamente colocada na câmara de Peters e levada ao microscópio óptico para contagem. Foram montadas seis câmaras de eclosão, cada uma contendo em média 25 mil ovos, visando a obtenção de 20 mil J2, quantidade necessária para cada inoculação.

A cada 24 horas cada câmara de eclosão tinha a suspensão coletada para recolhimento de J2 e, novamente, acrescentava-se água. Caso os J2 coletados não atingissem a quantidade mínima de 20 mil, estes eram mantidos em geladeira até o dia seguinte. Já quando obtida a quantidade necessária, eram imediatamente inoculados nas plantas.

Quando as plantas apresentavam cerca de 20 cm de altura foram realizadas as inoculações, com 10 mil juvenis por planta, sempre inoculando uma planta resistente e uma planta 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 uma das épocas, de acordo com a técnica descrita por Pegard et al. (2005).

Essa técnica consisti em retirar as plantas cuidadosamente da areia para que as raízes não sejam danificadas. A parte aérea foi cortada e descartada. As raízes foram lavadas em água corrente. Parte delas foi usada para os testes histológicos e outra parte para observação da penetração dos juvenis.

Para histopatologia as extremidades das raízes, principalmente radículas com cerca de 3 mm de comprimento, com ou sem galhas, foram retiradas com auxílio de bisturi e pinça fina, sob microscópio estereoscópico. Foram então colocadas em tubo eppendorf com capacidade para 1,5 mL. Em seguida esses segmentos de raiz foram fixados em solução de 1% (v:v) de glutaraldeído e 4% (v:v) de formaldeído, sob 100 mM, em tampão fosfato com pH 7,2 à temperatura ambiente. Posteriormente, foram mantidos sob agitação durante uma noite completa, em agitador rotatório, para melhor penetração da solução fixadora nas raízes, resultando em melhor fixação, sem a formação de bolhas no interior das raízes. Depois de fixadas, as extremidades das raízes foram lavadas por duas vezes, por trinta minutos cada, com tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7.2 em temperatura ambiente. Iniciou-se, então, a etapa de desidratação, colocando as raízes sob agitação, em temperatura de 4°C, em uma séria etanólica crescente de 10% a 100%, com intervalos de 20 minutos entre as trocas. A desidratação com a concentração de 100% foi repetida duas vezes.

Em seguida à desidratação, iniciou-se a fase da pré-infiltração. Foi adicionada às raízes uma mistura de etanol 100% e resina Technovit®, na proporção 1:1. As raízes foram colocadas sob agitação por uma noite e, no dia seguinte, a resina foi trocada e as amostras deixadas sob agitação por mais uma noite. Após essa pré-infiltração, foi realizada a infiltração propriamente dita. Em câmara de exaustão, foi preparada uma solução um (resina base + endurecedor Hardener I), conforme recomendação do fabricante. Essa solução foi adicionada às raízes, depois de retirada toda a resina base, e os tubos eppendorfs colocados para agitar por uma noite.

Na última etapa de preparação do material, a fase de emblocar, cada amostra contida em tubo eppendorf de 1,5 mL foi dividida em mais cinco amostras, em tubos

ependorfs de 0,2 mL, cada um contendo, em média, três segmentos de raízes. Neste foi adicionada a solução dois (solução um + Hardener II). Cada bloco (raízes emblocadas) foi cortado com navalhas de vidro em ultramicrótomo em secções de 3,5 µm, e colocado em uma gota de água sobre lâmina de vidro. Em seguida, foi posto para secar em uma placa aquecedora a 50° C.

Para raízes do genótipo suscetível, após os cortes se apresentarem completamente secos. Foram adicionadas sobre os cortes gotas do corante azul de toluidina a 1%. O excesso do corante foi removido com água e novamente colocado para secar em placa aquecedora. Posteriormente foram observados e fotodocumentados em microscópio óptico.

Para o material resistente, após secagem das lâminas, estas foram levadas ao microscópio sob luz UV, com filtro de 365 nm de excitação e 397 nm de emissão, para observar as reações de hipersensibilidade. Após essa observação e fotodocumentação foi feito realizado mesmo procedimento para o material suscetível com azul de toluidina.

As raízes destinadas à observação da penetração e desenvolvimento dos juvenis foram coradas com fucsina ácida (Byrd et al., 1983). As raízes foram lavadas e mergulhadas em 200 mL de solução aquosa de NaOCl a 5,25% por quatro minutos. Posteriormente, as raízes foram lavadas em água corrente por 45 segundos e mantidas em béquer com água por quinze minutos para retirar-se o excesso de NaOCl.

Em seguida, as raízes foram cortadas e transferidas para béquer com 2 mL de solução estoque de fucsina ácida (1,25 g de fucsina 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 em aparelho de microondas por 45 segundos. Depois de resfriadas naturalmente, as raízes foram descoradas com água fria e colocadas em placa de Petri de 6 cm de diâmetro, para que fossem observadas ao microscópio estereoscópico. As partes das raízes que mostraram a presença do nematoide foram colocadas em lâmina com uma gota de glicerol puro e levadas ao microscópio de luz, onde foram examinadas e fotodocumentadas.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho evidenciam que o genótipo TX 25 é resistente a *Meloidogyne incognita*, raça 3. Isto ficou evidente quando se observou as raízes coradas com fucsina ácida ou quando foram observados cortes de raízes corados com azul de toluidina. Notou-se que a penetração dos juvenis de segundo estágio nas raízes

do genótipo resistente foi visivelmente inferior aos que penetraram na variedade suscetível. Aos dois dias após a inoculação (DAI) já havia juvenis no interior das raízes da cultivar suscetível FiberMax 966 (Figura 3.1 A). Aos 4 DAI já havia juvenis migrando para o cilindro central (Figura 3.1 B) e aos 7 DAI havia muitos J2 paralelos ao cilindro central (Figura 3.1 C). Aos 11 DAI foi possível observar J2 já alimentados (Figura 3.1 D). Aos 18 DAI observa-se células gigantes bem formadas apresentando cariogênese (Figura 3.1 E-F). Aos 28 DAI já foram observadas fêmeas adultas (Figura 3.1 G-H), com ovários e ovidutos evidentes, mostrando nitidamente ser uma fêmea didelfa anfídelfa.

Sabe-se que os nematoides são atraídos para as raízes das plantas devido à liberação de exsudados radiculares. Assim, os juvenis de segundo estágio que eclodirem dos ovos migram em favor do gradiente de concentração desses exsudados e penetram nas raízes. Como era de se esperar, na variedade suscetível, os juvenis foram capazes de penetrar pelas radículas, migrar até o cilindro central e formar seu sítio de alimentação, resultando em células gigantes bem formadas e completando seu ciclo em torno de 3 a 4 semanas. Como a planta não ofereceu qualquer mecanismo de resistência, seja químico ou estrutural, o nematoide iniciou seu sítio de alimentação e teve início à formação de galhas nas raízes. Estas são provenientes de hiperplasia e hipertrofia das células, assim como Ferraz & Monteiro (2011) descrevem a biologia do nematoide sob condições favoráveis ao seu desenvolvimento.

Ao avaliar as raízes do genótipo resistente TX 25 coradas com fuscina ácida e os cortes corados com azul de toluidina, observados ao microscópio com filtro UV, notou-se um retardamento no ciclo do nematoide (Figura 3.2), no entanto, não foi observado HR responsável por atrasar a penetração do nematoide (Figura 3.2 A). Entretanto, quando as raízes foram examinadas aos 14 DAI fica evidente a resposta de HR, ao redor do nematoide e das células gigantes. O nematoide consegue estabelecer seu sítio de alimentação e apresenta células gigantes similares a do genótipo suscetível. As primeiras diferenças evidentes entre os dois genótipos (FM966 e TX-25) foram observadas aos 14-18 DAI quando as células gigantes adjacentes ao nematoide em raízes resistentes tiveram alguns vacúolos maiores que quase ocuparam todo o volume das células gigantes (Figura 3.2 E-F), enquanto que as células gigantes nas raízes do genótipo suscetível tinham citoplasma uniformemente denso com menos vacuolização (Figura 3.1 E-F). Alguns nematoides se desenvolveram normalmente no TX 25 antes de 14 DAI com base em observações no seu tamanho, formato e aparência do conteúdo interno (Figura 3.2 A). No

entanto, os nematoides presentes nas raízes de TX 25, até os 14-18 DAI, apresentaram desenvolvimento inferior ao suscetível FiberMax 966. Enquanto a largura do corpo do nematoide foi de 10 μm (Figura 3.1 F) no genótipo resistente, no suscetível foi de 50 μm (3.2 F). Isto é confirmado pela deterioração das células gigantes de TX 25, nesta fase, como a maioria dessas células pareciam estar à beira de um colapso e desprovida de qualquer citoplasma (Figura. 3.2 F), Em contraste, nas raízes do material suscetível apresentavam células gigantes robustas com citoplasma denso e paredes celulares espessas (Figura 3.1 F-G). Células gigantes defeituosas não são metabolicamente ativa o suficiente para fornecer os nutrientes ideais para o desenvolvimento e reprodução do nematoide. Aos 18 DAI (Figura 3.1F e 3.2 F) as diferenças no sítio de alimentação entre os dois acessos (FiberMax966 e TX25) eram claramente visíveis, mostrando células gigantes vazias em TX 25. Aos 28 DAI os complexos de células gigantes em raiz do algodoeiro resistente tinha desmoronado completamente e o tecido celular da raiz foi severamente comprometidos. Após essa fase observou-se apenas J2 (Figura 3.2 A-F) não observado se observou avanços para fases posteriores, como fêmeas adultas, por exemplo.

A presença prolongada de J2 pode ser explicado pela atividade metabólica de células gigantes e / ou o aumento da produção de compostos fenólicos, fornecimento de alimentação de qualidade inferior para nematoide. A presença de compostos fenólicos (azul fluorescentesmaterial) é visível dentro do intestino de J2s (Figura 3.2 H). Nas raízes do algodoeiro suscetível aos 28 DAI a maior parte dos nematoides tinha desenvolvido e foi observado fêmeas adultas, ovários bem desenvolvido pode ser visto nas secções finas (Figura 3.1H).

Nas raízes do genótipo suscetível aos 28 DAI, os nematoides haviam se desenvolvidos e apresentavam fêmeas adultas e com ovários desenvolvidos (Figura 3.2 H). A dimensão das células gigantes não diferiu entre os sítios de infecção dos genótipos suscetíveis FiberMax 966 e resistente TX 25, até os 14 DAI. As células gigantes medidas depois dos 14-18 DAI foram maiores nas raízes do genótipo suscetível que no resistente. Embora a reação de resistência no genótipo TX 25 era atrasada o desenvolvimento da maioria das fêmeas do nematoide foi atrasado nas raízes do TX 25, mostrando que não se desenvolveram até a maturidade. Assim, aos 28 DAI era visível o colapso das células gigantes. Observações externas das raízes aos 45 DAI revelou galhas bem desenvolvidas em raízes suscetíveis, enquanto que no genótipo resistente TX 25 apenas algumas pequenas galhas.

Curiosamente, a penetração nas raízes por juvenis de segundo estágio não foi afetada no acesso de *G. hirsutum* TX 25, e não houve evidência de reação de hipersensibilidade inicialmente. Os nematoides foram capazes de iniciar e manter as células gigantes aparentemente saudáveis em raízes do genótipo resistente por cerca de 2 semanas antes de aparecer sinais visíveis de deterioração, levando ao colapso das células gigantes. O mesmo foi observado em caupi resistente por Das et al. (2008). Resposta da resistência atrasada contra *M. incognita* foi relatada em tabaco (Powell, 1962), onde uma reação tardia de hipersensibilidade também foi visto em células gigantes desenvolvidas. Uma diferença significativa de vacuolização celular foi observada entre o genótipo de algodoeiro resistente e suscetível a partir de 14 DAI, e é possível que os grandes vacúolos em raízes de algodão resistente TX 25, foram preenchidos com hidrolases e toxinas que privou os nematoides de nutrientes e levou a célula gigante entrar em colapso.

Pegard et al. (2005) observaram efeito antagônico de compostos fenólicos (ácido clorogênico) em J2 de *Meloidogyne*. O efeito nocivo do ácido clorogênico ocorre porque o nematoide, ao se alimentar, ingere esse composto, o qual age no sistema nervoso dos nematoides, influenciando negativamente sua coordenação motora e conseqüentemente na habilidade em se movimentar no solo e encontrar a planta hospedeira. Ruang & Rhole (1973) afirmam ainda que esse ácido está associado ao retardamento do desenvolvimento de J2, prolongando a fase juvenil e diminuindo a população do nematoide. Esse mecanismo de resistência retardou o desenvolvimento dos juvenis, aumentando a duração do ciclo biológico do nematoide dentro da raiz; pois no genótipo TX 25 foram observadas fêmeas adultas apenas aos 45 DAI, enquanto em FiberMax 966, foram observadas fêmeas adultas já aos 28 DAI. Isso confirma que o mecanismo de resistência do genótipo TX 25 diminui as gerações do nematoide na área.

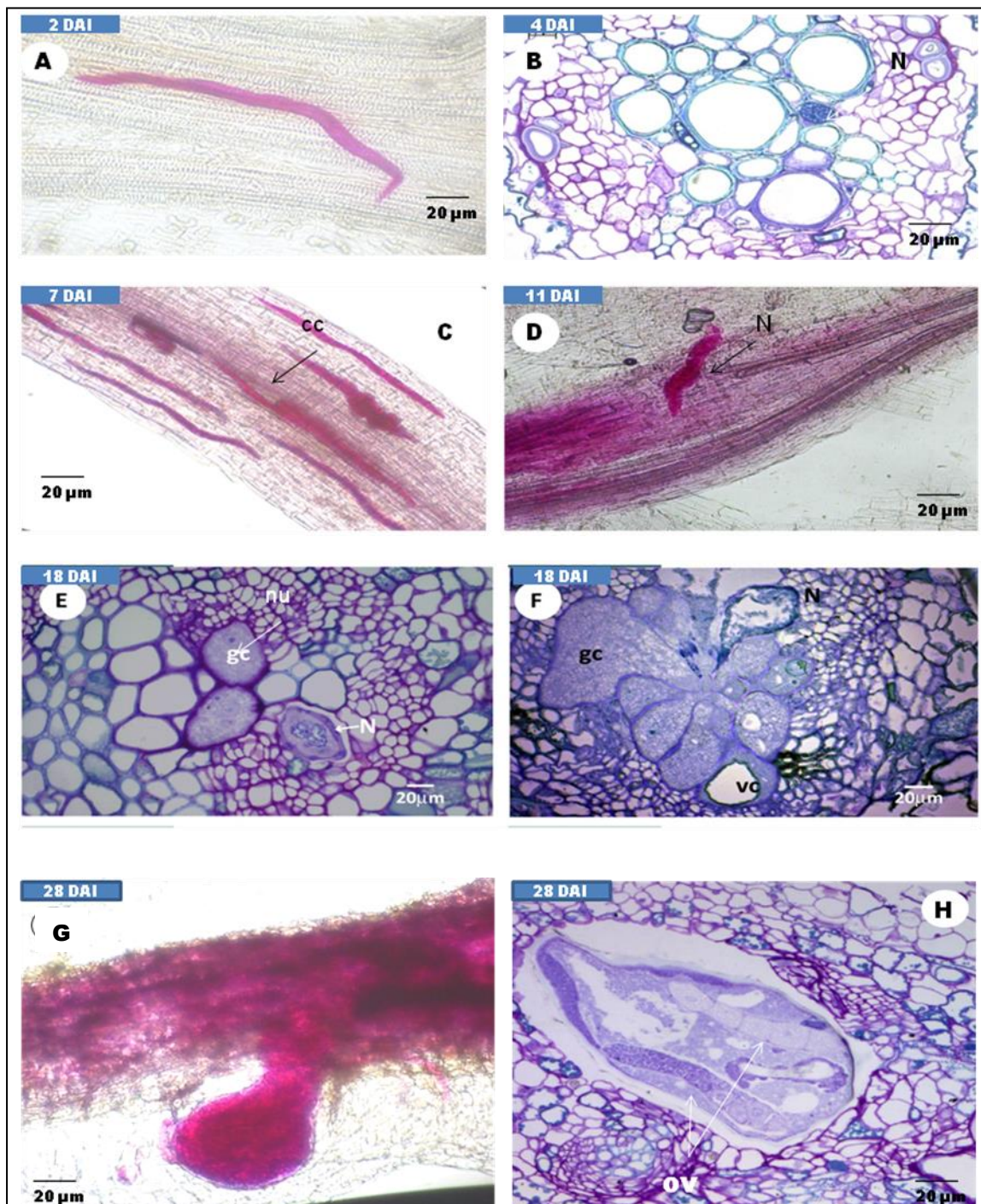


Figura 3.1. Raízes de *Gossypium hirsutum*, material suscetível FiberMax 966, inoculados com *Meloidogyne incognita*, raça 3. A, C, D, coradas com fuscina ácida e B, E, F, G, H coradas com azul de toluidina. N: nematoide; gc:células gigantes; nu: núcleo; vc: vacúolo; co: córtex; cc: cilindro central, ov: ovário.

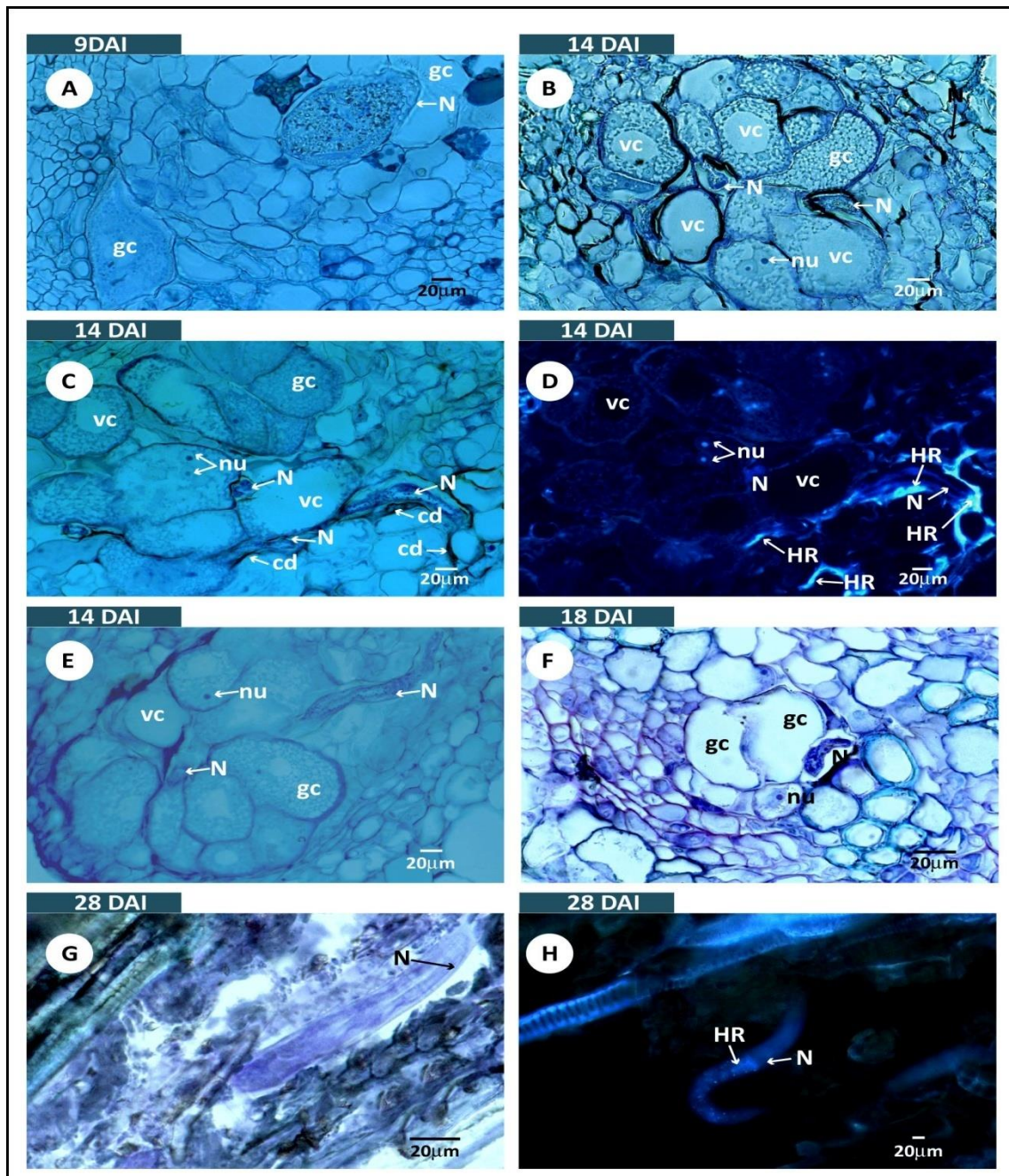


Figura 3.2 Raízes de *Gossypium hirsutum*, genótipo resistente TX 25, inoculados com *Meloidogyne incognita*, raça 3. A, B, C, E, F, G coradas com azul de toluidina. D e H: observadas com filtro UV. N: nematoide; HR: Reação de hipersensibilidade; gc: células gigantes; nu: núcleo; vc: vacúolo; cd: células degeneradas

4 COMPARAÇÃO BIOQUÍMICA ENTRE ALGODOEIRO RESISTENTE E SUSCETÍVEL A *Meloidogyne incognita*, raça 3

RESUMO

As plantas produzem uma vasta gama de compostos secundários com as mais variadas funções, e dentre estas funções destacam-se a defesa da planta contra patógenos. Estas substâncias podem ser pré ou pós-formadas, ou seja, podem existir na planta independente da presença do patógeno, ou ser produzidas somente após a planta ser infectada pelo patógeno. O presente trabalho teve como objetivo identificar a atividade bioquímica em cultivares de algodão resistente e suscetível, incitada pelo ataque de *Meloidogyne incognita* raça 3. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e inoculadas com 5000 ovos e J2, por planta, concentrados em 5 mL. Aos oito, 24 e 35 dias após a inoculação as plantas foram retiradas dos vasos, a parte aérea descartada e, com as raízes, foram preparados os extratos para quantificação de fenóis totais, flavonóides, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e quantificação de metabólitos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN). Foi observado que a concentração de fenóis totais não diferiu entre os genótipos e sim entre os tempos após a inoculação, apresentando maior concentração aos 35 DAI. Na cromatografia líquida conseguiu-se quantificar flavonóides glicosilados e derivados de gossipol. Verificou-se também que um flavonóide glicosilado foi um dos compostos secundários responsáveis que podem ter garantido proteção ao genótipo TX 25, pois esse composto esteve presente em todas as avaliações, sempre em maior concentração neste genótipo. No RMN, verificou-se que os açúcares também podem conferir proteção inicial ao genótipo TX 25.

Palavras-chave: Metabólitos secundários, gossipol, flavonóides, nematoide de galhas

ABSTRACT

BIOCHEMICAL COMPARISON BETWEEN COTTON RESISTANT AND SUSCEPTIBLE TO *Meloidogyne incognita* RACE 3

Plants produce a wide range of secondary compounds with varied functions, such as the plant defense against pathogens. These substances may be pre or post formed, or may exist in the plant independent of the presence of the pathogen. Thus, the present

research aimed to identify the biochemical activity in cotton cultivars resistant and susceptible *Meloidogyne incognita* race 3. The plants were conducted under greenhouse conditions and inoculated with 5,000 eggs and J2 per plant, concentrated in 5 mL. At eight, 24 and 35 days after planting, the plants were removed from the pots and root extracts were prepared for quantification of total phenols, flavonoids, high performance liquid chromatography (HPLC) and metabolite quantification by nuclear magnetic resonance of hydrogen (RMN). And it was observed that the total phenols only differ according to the time after inoculation, with higher concentrations at 35 DAI. In liquid chromatography it was possible to quantify flavonoid glycosides and gossypol derivatives. It was also found that a flavonoid glycoside was one of the secondary compounds responsible for ensuring protection to genotype TX 25 because this compound was present in all evaluations, always in higher concentrations in TX 25. In NMR, it was found that sugars also confer an initial protection genotype TX 25.

Key words: Secondary metabolites, gossypol, flavonoids, root knot nematode

5.1 INTRODUÇÃO

É sabido que *Meloidogyne incognita* é um dos grandes problemas da cotonicultura mundial. Esse nematoide infecta o sistema radicular do algodoeiro causando alterações fisiológicas. O nematoide ao se alimentar injeta, na raiz da planta hospedeira, toxinas que favorecem o aumento das células em número e tamanho, formando galhas (Lordello, 1992).

Algumas substâncias produzidas pelas plantas ou são nocivas ao patógeno ou criam condições adversas ao seu crescimento (Pascholati, 2011). Estas substâncias podem ser pré ou pós-formadas, ou seja, podem existir na planta independentemente da presença do patógeno, ou ser produzidas somente após a planta ser infectada pelo patógeno.

Metabólitos secundários produzidos pelas plantas como gossypol, triterpenoides, sesquiterpenoide quinonas, hemigossipols e heliocides são estudados como compostos nocivos a diversos patógenos (Stipanovic et al., 1977). Estudo mostra que a presença de gossypol, como hemigossypol e aldeídos terpenóides inibe a germinação de esporos fúngicos, bem como sua penetração como, por exemplo, para *Verticillium dahliae* (Zaki et al., 1972).

Aldeídos terpenóides individuais diferem nos seus efeitos sobre as pragas e patógenos. Os precursores desoxihemigossipol e hemigossipol que ocorrem em raízes de algodão são altamente tóxicos aos patógenos, enquanto o produto final, gossipol, inibe patógenos radiculares apenas em concentrações mais elevadas (Stipanovic et al., 1988).

Em algodão é comum o relato da presença de compostos fenólicos atuando no controle de determinados patógenos, dentre eles os nematoides (Sitaramaiah & Pathak, 1979). Estudos realizados por Khoshkhoo et al. (1994) mostraram que em genótipos resistentes a *Meloidogyne incognita* ocorria aumento da quantidade de terpenóides da planta, quatro dias após a inoculação com o nematoide. Entretanto McClure (1972), estudando cultivares de algodoeiro resistentes e suscetíveis a *M. incognita*, observou diferenças significativas na quantidade de açúcares. Segundo este autor, a quantidade de sucrose foi de 87 mg/g na variedade resistente, Cleve-wilt, e 82 mg/g na cultivar suscetível Deltapine. Silva et al. (2008) trabalhando com *Criconemella xenoplax* em pessegueiro, constataram que a maior suscetibilidade das cultivares ao nematoide estava relacionada diretamente com as reservas de carboidratos na planta, confirmando o estudo de McClure (1972).

Para tentar elucidar os mecanismos de resistência das plantas aos patógenos alguns testes bioquímicos são essenciais. Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar atividades bioquímicas diferenciadas em cultivares de algodão resistente e suscetível a *Meloidogyne incognita* raça 3.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção do inóculo uma raiz de tomate (*Solanum lycopersicum*) do grupo Santa Cruz, cultivar Santa Clara, foi cedida pelo laboratório de nematologia do Cenargen para iniciar a multiplicação do *M. incognita* raça 3. Inicialmente, a população foi oriunda de área de algodão naturalmente infestada em Londrina, Paraná. A identificação da espécie e da raça foi feita na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen. A espécie foi identificada por meio do fenótipo das esterases (Carneiro & Almeida, 2001) e do marcador SCAR (*sequence-characterized amplified region*) (Randig et al., 2002). A diferenciação de raça também foi realizada no Cenargen. A raça foi determinada usando-se o teste com hospedeiros diferenciadores, de acordo com o método proposto por Hartman & Sasser (1985). Na Universidade Federal de Goiás, esse inóculo inicial foi mantido em casa de vegetação por três meses, também em tomateiro Santa Cruz, cultivar Kada, em vasos

com substrato composto por mistura de solo, areia e substrato comercial (Germinar[®]), na proporção de 1:1:1. O substrato foi previamente autoclavado a 120°C, e pressão de 1 kgf por vinte minutos. Ao final de noventa dias, retirou-se a parte aérea das plantas e as raízes foram cortadas e trituradas em liquidificador com água e hipoclorito de sódio (NaOCl a 0,5%) por um minuto (Hussey & Barker, 1973). A concentração de ovos foi determinada por meio de contagem em microscópio óptico com aumento de 100x, com auxílio de câmara de Peters.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando-se dois genótipo de algodão, TX 25 (resistente) e a cultivar FiberMax966 (suscetível). Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com 21 repetições e arranjo fatorial dos tratamentos de 2 x 2 x 3. Sendo: 2 genótipos, 2 genótipos inoculados e não inoculados e 3 períodos de inoculação. Totalizando 42 plantas, isto é, 21 plantas de TX 25 e 21 FiberMax 966. Para a semeadura foram utilizados sacos plásticos com capacidade para um litro, preenchidos com areia autoclavada a temperatura de 120°C e pressão de 1 kgf por vinte minutos.

Quando as plantas apresentaram em torno de 20-30 cm de altura, em média aos vinte dias após a emergência, foi feita a inoculação em metade das plantas de FiberMax 966 e metade das plantas da TX 25 com 5000 ovos e juvenis de segundo estágio, por planta, concentrados em 5 mL.

As avaliações foram realizadas em diferentes tempos após a inoculação, sendo T1: 8 dias após a inoculação (DAI), T2: 24 DAI, T3: 35 DAI. Em cada uma dessas avaliações as plantas foram retiradas cuidadosamente dos saquinhos. A parte aérea foi descartada e as raízes levadas ao laboratório para serem lavadas, liofilizadas e pesadas.

Para a obtenção do extrato bruto as amostras seguiram o seguinte protocolo: pesaram-se 100 mg das raízes cortadas em tubo de ensaio, adicionaram-se 5 mL de etanol a 96% e mergulhado por quinze minutos em banho de ultra-som. Em seguida, os tubos de ensaio contendo as raízes, mais o etanol foram centrifugados por cinco minutos e decantou o extrato para balão volumétrico de 10 mL. Este procedimento foi repetido mais três vezes, alterando apenas a quantidade do etanol usado como solvente, que foi de 3 mL, 2 mL e 1 mL. Adicionaram ao tubo mais 3 mL de etanol a 96% e extraiu-se por mais 15 minutos. Os extratos tiveram o volume ajustado para 10 mL com etanol a 96%.

O método utilizado para extração de fenóis totais foi o de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Escarpa & González (2001). Em balão volumétrico de 25 mL

adicionou-se 5 mL de água, 0,5 mL do extrato e mais 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma–Aldrich). Após cinco minutos adicionaram 10 mL de solução de carbonato de sódio a 20% e completou-se o volume para 25 mL com água destilada. Após uma hora foi realizada a leitura da absorbância, a 750 nm em espectrômetro Beckman DU-70. Construiu-se uma curva de calibração com ácido gálico como padrão (0,08 a 0,6 mg/mL; $y = 0,0828 + 1,67706x$; $r^2 = 0,9989$) e os resultados foram apresentados como concentração de ácido gálico equivalente em mg/g de raiz seca. Todas as avaliações foram realizadas em duplicata.

A quantificação de flavonoides totais foi feito pelo procedimento descrito por Petry et al. (1998). Todo o procedimento foi feito em capela de exaustão. Em balão volumétrico de 10 mL adicionaram-se 2,5 mL do extrato das raízes, 1,0 mL de solução etanólica de cloreto de alumínio a 12% e o restante do volume foi completado com solução etanólica de ácido glacial a 5%. A absorbância foi medida utilizando como branco uma solução de compensação, preparada utilizando-se balão volumétrico de 10 mL, onde adicionaram 2,5 mL do extrato e completou-se o volume com solução de ácido glacial a 5%. Após trinta minutos foi feita a leitura das amostras extrativas e da solução de compensação com absorbância a 422 nm. A curva de calibração foi estimada com solução de rutina padrão (0,1 a 0,4 mg/mL; $y = 0,03729 + 0,00296x$; $r^2 = 0,9994$) e os resultados foram apresentados como concentração de rutina equivalente em mg/g de raiz seca. Todas as avaliações foram realizados em duplicata.

As análises para quantificação de fenóis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram executadas em aparelho Shimadzu, com sistema binário de bombas LC-10ADvp e detector de arranjo de diodos SPD-M10ADvp, operado pelo programa Class-VP 3.0. As seguintes condições foram utilizadas: volume de injeção de 20 μ L, coluna LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m), 25 cm x 0,4 cm d.i. (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), eluída com acetonitrila (A) solução KH_2PO_4 0,01 mol/L e H_3PO_4 até pH 3,0 (B) (sistema isocrático: 70% A e 30% B). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min, com detecção a 235 nm.

Na quantificação de metabólitos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H): Uma alíquota de 4,0 mL de cada extrato foi evaporada com nitrogênio e liofilizada. O extrato seco foi dissolvido em 0,58 mL de metanol- d_4 (CIL), o qual adicionou-se 0,02 mL de solução a 1% (m/v) de ácido gálico (Sigma-Aldrich) em metanol- d_4 , como padrão interno. Trimetilsilano foi utilizado como referência do $\delta = 0,00$

ppm. Os espectros foram obtidos em aparelho de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance III – 500, que opera a 500,13 MHz para ^1H . Os parâmetros utilizados foram: janela espectral de 15 ppm; foram coletados 65 K pontos de dados, após 128 *scans*, reciclados com atraso de um segundo e ângulo flip de 90° , com tempo de aquisição de 4,37 segundos à temperatura fixa de 25°C . A análise dos dados foi realizada com o programa TOPSPIN 2.1 (Bruker BioSpin Corp., MA, EUA). O ácido gálico foi utilizado como referência para integração e para os cálculos ($\delta = 7,05\text{ ppm (2H, s)}$).

Os dados obtidos para fenóis totais e flavonóides foram submetidos à análises de variância conforme o delineamento experimental adotado (fatorial $2 \times 2 \times 3$ inteiramente casualizado). As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados referentes a substâncias fenólicas quantificadas por cromatografia foram analisados separadamente para cada período de avaliação (8, 24 e 35 DAI), isto é como fatorial 2×2 inteiramente casualizados. As médias também foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. No caso dos dados de quantificação de metabólitos, o teste de Tukey foi aplicado a 1% de probabilidade. Em todas as análises foram usados os dados originais.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação de fenóis totais (Tabela 4.1) observou-se que não houve diferença ($p > 0,5$) entre as médias do TX 25 resistente e FiberMax 966 suscetível, bem como entre inoculados e não inoculados. Foi observado diferença significativa ($p < 0,5$) no tempo de inoculação. As plantas com 35 dias após a inoculação (DAI) apresentaram maior concentração de fenóis que aos 8 DAI e 24 DAI, indicando que esses compostos têm sua produção aumentada na planta à medida que esta se desenvolve. Este aumento na concentrações de fenóis foi percebido tanto para o genótipo resistente TX 25, quanto para o genótipo suscetível FiberMax 966. Este resultado difere de outros resultados da literatura onde os autores afirmam que o algodoeiro produz gossipol que confere resistência a *M. incognita* Page & Bridge, (1994). E que, nas variedades resistentes a concentração desse metabólito é mais elevada e, apresenta maior toxicidade aos juvenis (Veech, 1982). Para flavonoides não foi observada diferença estatística em qualquer das fontes de variação avaliadas (Tabela 4.1). Entretanto trabalhos têm sido publicados mostrando o efeito nematicida e nematostático de extratos de sementes de diversas plantas. Esse efeito nocivo aos nematoides, os pesquisadores associam com a presença de lecitinas e metabólitos

secundários como: alcaloides, terpenos, taninos, flavonoides e glicosídeos (Walla et. al., 1999; Molan et. al., 2000).

Tabela 4.1 Médias de fenóis e flavonoides em algodoeiro resistente (TX 25) e suscetível (FiberMax 966), a *Meloidogyne incognita*, raça 3. Goiânia, 2013

	Tratamentos	Fenois Totais (mg/g de raiz)	Flavonoides (mg/g de raiz)
Genótipos (A)	TX 25	32,81a	19,04 ^a
	FiberMax 966	29,70a	21,86 ^a
Inoculação (B)	Com	31,32a	20,21 ^a
	Sem	31,22a	20,69 ^a
Período após a inoculação (C)	8 DAI	29,83 b	19,63 ^a
	24 DAI	27,31 b	20,31 ^a
	35 DAI	36,67 a	21,42a
Interação (D)	A X B	2,91	0,10
	A X C	3,50	0,24
	B X C	0,87	3,06
	A X B X C	1,51 ^{NS}	2,13 ^{NS}

¹ Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si; (Tukey $p < 0,05$); ² Dias após a inoculação (DAI)

Na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi possível quantificar os compostos em onze picos, identificados como P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10 e P11 (Figura 4.1 a 4.3). Pelo comportamento das curvas plotadas, observação do tempo de retenção e de acordo com os espectros de ultra violeta (UV) observados na literatura, mais a comparação com a suspensão padrão verificou-se a presença de flavonoides glicosilados e derivados de gossipol. Esses picos correspondem às porcentagens de substâncias fenólicas existentes no genótipo resistente TX 25 e no suscetível FiberMax 966 (Tabela 2). As substâncias identificadas como um dois, três (Figura 4.1 A-C) e sete (Figura 4.2 C), não foram identificadas devido às respectivas curvas de UV não se apresentarem de forma característica a uma determinada substância e sim como uma misturas de substâncias. As substâncias quatro (Figura 4.1 D), cinco (Figura 4.2 A), seis (Figura 4.2 B) e oito (Figura 4.2 D) apresentam curvas semelhantes ao grupo dos flavonóides glicolisados. As substâncias nove, dez e onze (Figura 4.3 A-C) apresentaram curvas semelhantes a derivados de gossipol. A identificação e a quantificação desses compostos foi importante, pois, é sabido que alguns grupos destes identificados conferem algum tipo de proteção a planta, contra fitonematoides, o como é o caso de flavonoides e alguns gossipóis.

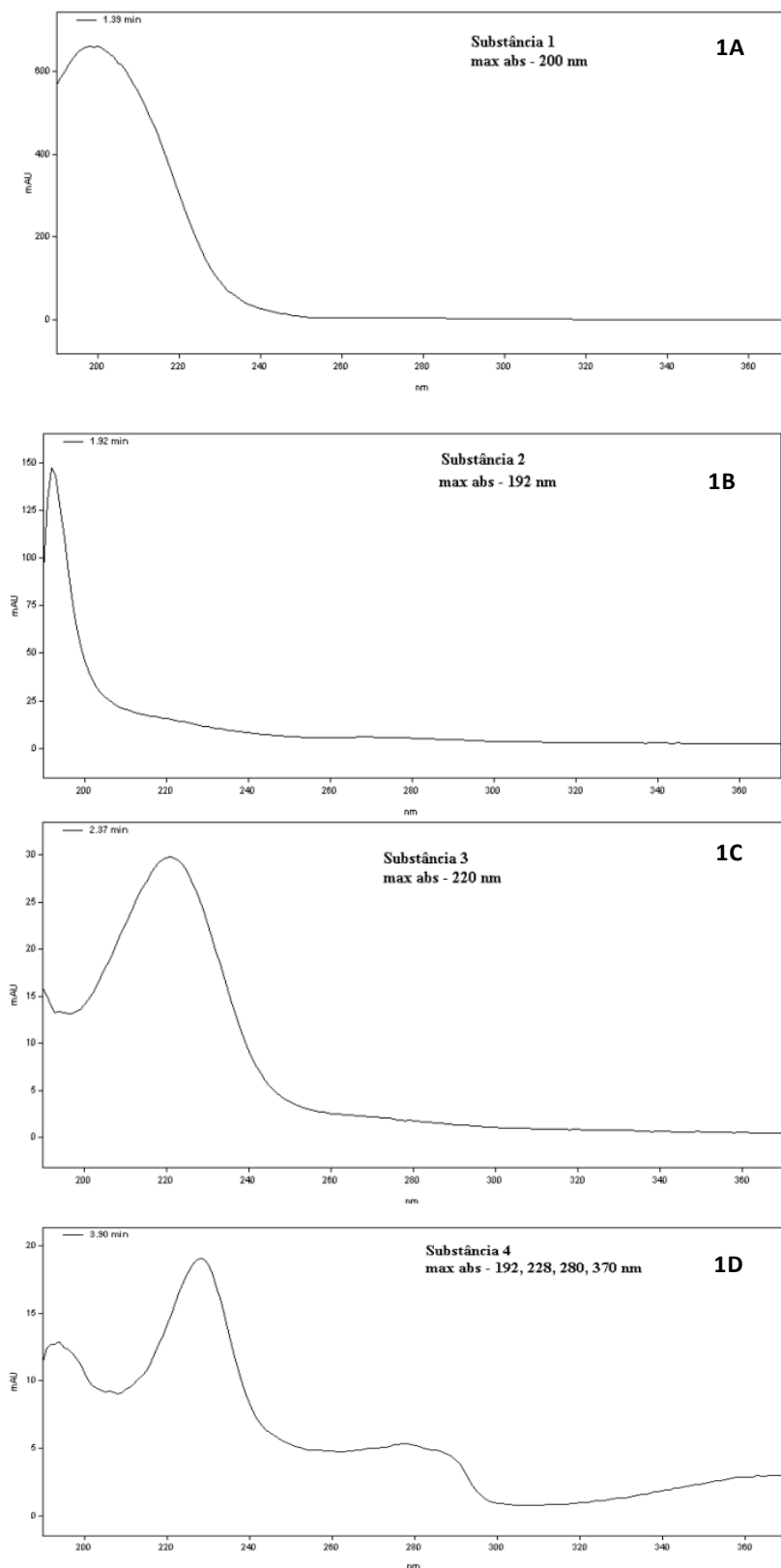


Figura 4.1 Espectro de UV de substâncias encontradas nas raízes dos genótipos FiberMax 966 e TX 25 (Solvente - acetonitrila: água pH 3,0), 1A, 1B, 1C: substâncias não identificadas. 1D: grupo dos flavonóides glicosilados.

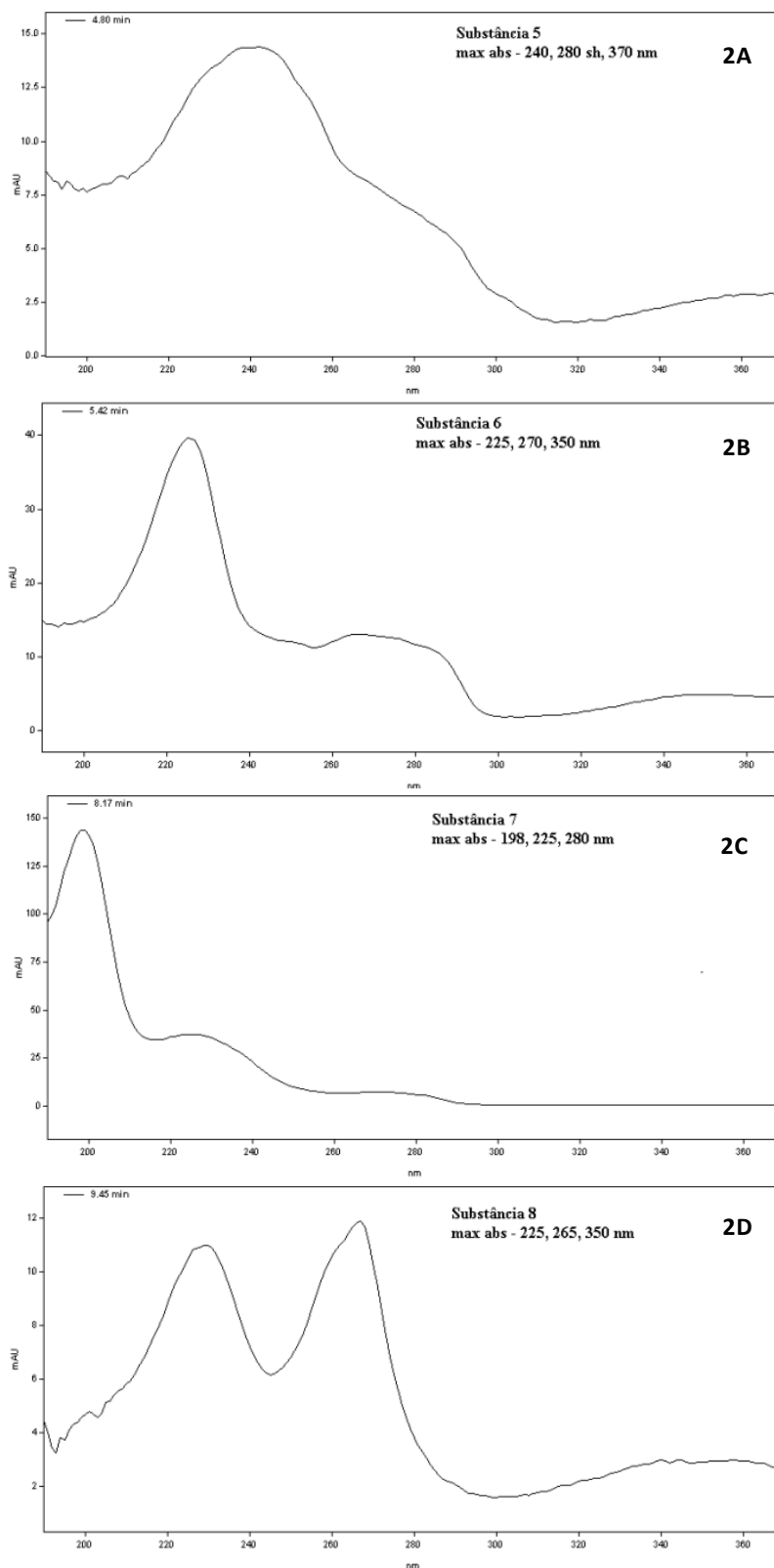


Figura 4.2 Espectro de UV de substâncias encontradas nas raízes dos genótipos FiberMax 966 e TX 25 (Solvente - acetonitrila: água pH 3,0), 2A e 2B: grupo dos flavonóides glicosados; 2C: substâncias não identificada. 2D: grupo dos flavonóides glicosados.

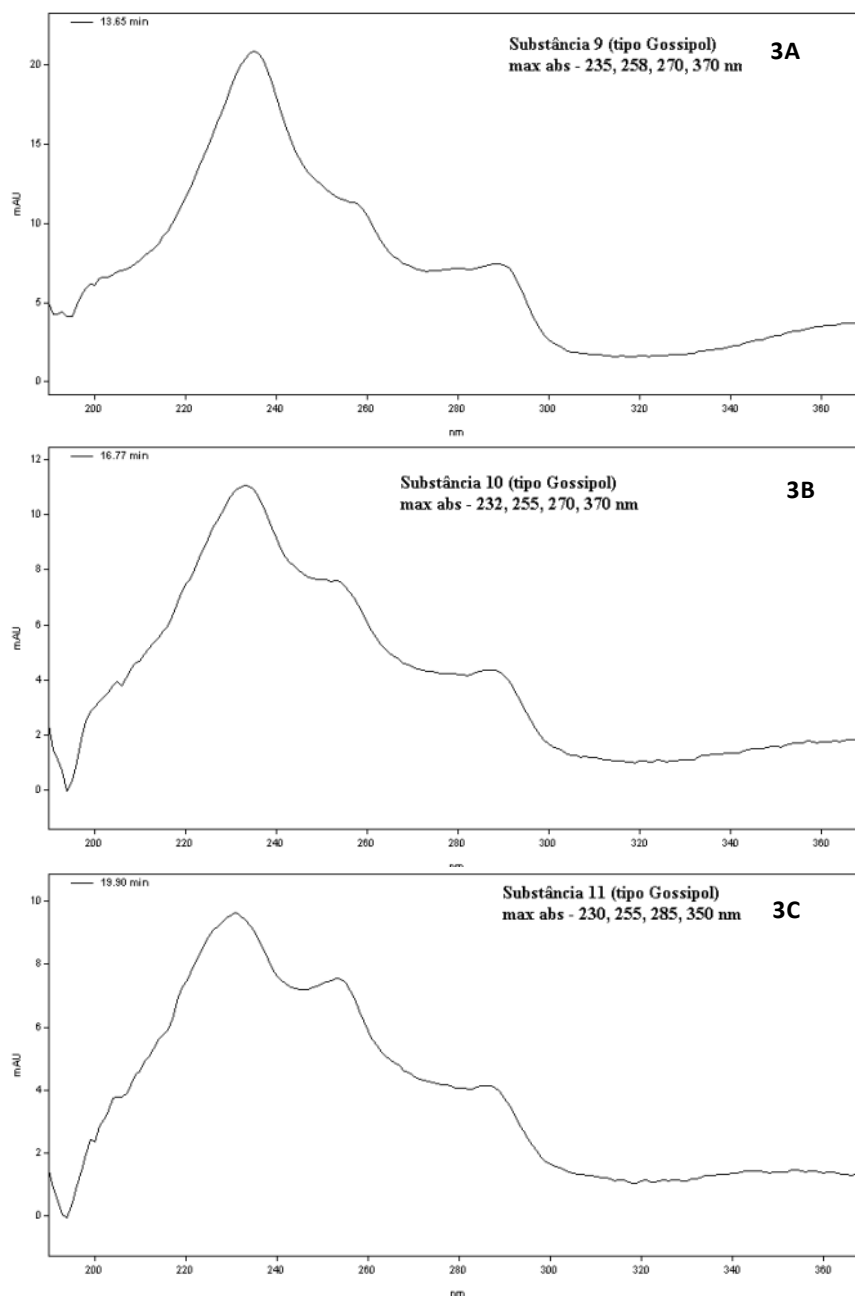


Figura 4.3 Espectro de UV de substâncias encontradas nas raízes dos genótipos FiberMax 966 e TX 25 (Solvente - acetonitrila: água pH 3,0), 3A, 3B e 3C: derivados de gossipol.

Aos oito dias após a inoculação, as substâncias retidas nos P6, P7 e P8 (Tabela 4.2) apresentaram diferença estatística entre os genótipos. As substâncias retidas nos P6, P7 e P8 apresentaram maiores concentrações no genótipo resistente, TX 25, indicando que estas substâncias podem estar relacionada à resistência desse genótipo a *M. incognita* raça 3. Exceto o a substância retida no P7, as demais são flavonóides glicosilados. Estes resultados corroboram com a literatura, que classifica flavonóides como metabólitos secundários que estão relacionados com a proteção da planta contra o ataque de patógenos

Engel et al. (2002). E segundo Walla et al., 1999; Molan, et al., 2000, os flavonóides presentes em extratos de plantas antagonistas demonstram efeito nematicida e nematostático a *M. incognita*. Este efeito nocivo ocorre porque os flavonóides são derivados de antocianinas e estas são tóxicas a alguns patógenos (Merken & Beecher, 2000).

Analisando as plantas quanto inoculação (Tabela 4.2) nota-se que as substâncias detectadas em P1 e P11 estão presentes em maior concentração nas plantas não inoculadas. A substância retida em P1 não foi identificada e a substância retida em P11 é do grupo dos derivados de gossipol. Este metabólito secundário é conhecido como fitoalexina, e está presente em todos os tecidos do algodão. Os triterpenoides, um tipo de gossipol ocorre mais comumente em sementes, folhas e raízes de plantas jovens (Beii et. al., 1965).

O resultado do estudo aos oito dias após a inoculação mostra que estas substâncias provavelmente não estão relacionadas à resistência de *M. incognita*. Pois, se o metabólito está numa concentração mais elevada na planta, e quando esta é incitada pelo nematoide a concentração é reduzida em 63% para a primeira substância e em 0,8% para a substância 11, do grupo dos derivados de gossipol (Tabela 4.2), indica que o nematoide exerce uma certa influência negativa na produção desses metabólitos. Logo, não poderia estar relacionado a resistência da planta ao nematoide.

A substância observada em P9, derivado de gossipol, apresentou em maior concentração nas plantas inoculadas. Esse resultado permite duas conclusões. A substância pertencente ao grupo dos gossipóis e está relacionada diretamente com a proteção da planta contra o nematoide. Pois, há um aumento da síntese de gossipol nas células onde o nematoide estabelece seu sítio de alimentação. Assim o nematoide ou cessa sua alimentação e morre por inanição ou se alimenta de gossipol, composto tóxico a esse patógeno. Outra conclusão seria que este gossipol não está relacionado a resistência, uma vez que a planta inoculada com o nematoide é a que apresenta maior concentração desse metabólito, inferindo que este não está afetando o comportamento de *M. incognita*. Contudo, vale ressaltar que há na literatura relatos de que gossipol são nocivos a nematoides. Que gossipol pode restringir a movimentação dos nematoides e dependendo das concentrações pode ter efeito nematicida. Nenhuma substância encontrada se apresentou com interação entre genótipos e interação (Veech, 1978).

Tabela 4.2 Porcentagem de substâncias fenólicas quantificadas por CLAE, em algodoeiro resistente (TX 25) e suscetível (FiberMax 966) com tempo de retenção em minutos, aos oito dias após a inoculação (DAI), Goiânia, 2013.

Genótipos (A)	Picos (Tempo de retenção em minutos) de substâncias fenólicas										
	1,39 ¹ P1 ²	1,92 P2	2,37 P3	3,90 P4	4,74 P5	5,31 P6	8,13 P7	9,45 P8	13,63 P9	16,60 P10	19,90 P11
TX 25	3,24a	0,72a	1,38a	1,72a	1,11b	3,98a	3,37a	5,89a	21,75a	16,60a	35,94a
FM966	3,57a	0,78a	1,48a	1,69a	1,68a	2,81b	0,44b	4,99b	22,42a	17,45a	38,80a
F	0,52 ^{NS}	0,51 ^{NS}	0,57 ^{NS}	0,16 ^{NS}	9,95*	10,89*	24,47*	13,32*	0,18 ^{NS}	0,46 ^{NS}	3,67 ^{NS}
Inoculação (B)											
Com	2,65b	0,67a	1,34a	1,67a	1,38a	3,13a	1,98a	5,32a	25,38a	17,97	35,08b
Sem	4,16a	0,78a	1,52a	1,69a	1,41a	2,81a	1,84a	4,99a	18,80b	17,45	39,66a
F	10,82*	3,77 ^{NS}	2,16 ^{NS}	1,05 ^{NS}	0,02 ^{NS}	2,30 ^{NS}	0,05 ^{NS}	0,91 ^{NS}	18,08*	1,41 ^{NS}	9,40*
Inter. (A) x (B)	1,39 ^{NS}	0,35 ^{NS}	0,90 ^{NS}	0,19 ^{NS}	1,61 ^{NS}	0,10 ^{NS}	0,11 ^{NS}	0,27 ^{NS}	2,95 ^{NS}	6,37 ^{NS}	10,26 ^{NS}
CV(%)	37,94	27,00	20,70	11,03	31,34	25,64	75,9	10,9	17	9,79	10,8

¹ Tempo de retenção em minutos; ² P1 a P11: porcentagem de substâncias fenólicas. Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem Estatisticamente entre si. *Significativo a 5% pelo teste de Tukey; ^{NS} Não significativo a 5% pelo teste de Tukey.

Tabela 4.3 Interação entre genótipos resistente (TX 25) e suscetível (FiberMax 966) quando inoculados com *Meloidogyne incognita* raça 3 aos oito DAI. Goiânia, 2013.

Genótipos	Pico 10		Pico 11	
	Com	Sem	Com	Sem
TX 25	18,2583 Aa	15,7000 bB	31,2517 bB	40,6300 aA
FIBERMAX	16,9917 aA	17,91000aA	38,9100 aA	38,7050 aA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si (**Tukey 1% e *Tukey 5%)

A interação aos oito dias após a inoculação (Tabela 4.3), não mostrou diferença estatística entre os genótipos com a presença do nematoide. Contudo ao compará-los sem a presença do nematoide, notou-se que o TX 25 apresentou menor concentração da substância retida no pico 10. E, ao analisar os genótipos individualmente nota-se que não houve diferença na concentração dessa substância no genótipo FiberMax 966. Já o genótipo TX 25 apresentou menor concentração da substância nas plantas sem a presença do nematoide. Esse resultado indica que esse derivado de gossipol, retido no pico 10, provavelmente não está relacionado a resistência da planta.

Analisando a outra interação, ocorrida aos oito dias após a inoculação com outro grupo de derivados de gossipol, retido no pico 11 (Tabela 4.3), mostra que há diferença significativa entre os genótipos resistente TX 25 e o suscetível FiberMax 966, na presença do nematoide. Sendo que esta substância é produzida em maior quantidade no genótipo suscetível. Os genótipos sem a presença do nematoide não foi observado diferença estatística. Contudo ao analisar o genótipo TX 25 observou diferença estatística entre plantas com e sem a presença do nematoide. Sendo que nas plantas sem a presença do nematoide a concentração desse grupo de derivados de gossipol foi maior. Resultado este já observado na tabela 4.2. Assim, sugere-se e também que esse grupo de derivados de gossipol não está relacionado com a resistência do algodoeiro a *M. incognita* raça 3. Assim, a interação observada nos dois picos, 10 e 11, ambos identificados como derivados de gossipol, não estão relacionados a resistência desse algodoeiro ao nematoide.

Aos 24 DAI os picos que apresentaram diferença estatística quanto ao genótipo foram P4, P5, P6, P8, P9, P10 e P11 (Tabela 4.3). A substância retida no P5 e P8 são flavonoides glicosilados e aparecem em maior concentração no genótipo resistente TX 25. O flavonoide retido no pico oito, repete o mesmo comportamento apresentado aos 8 DAI (Tabela 4.2), confirmando a hipótese de ser um composto envolvido na resistência bioquímica desse genótipo de algodão ao *M. incognita*. O P11 é um derivado de gossipol, que foi retido aos 19,90 minutos, com uma concentração de 8,48% a mais na cultivar resistente que na suscetível (Tabela 4.4).

Veech & McClure (1977) trabalhando com interferência de compostos químicos na resistência de algodão a *M. incognita*, afirmam que terpenoides, que é um gossipol, é um metabólito natural em plantas de algodão e está presente em sua constituição química, independente da presença ou não de patógenos. Contudo a medida que a planta vai se desenvolvendo, ocorre um aumento na produção destes compostos. Bem como, esse aumento na síntese de terpenoide está associada com a infecção do sistema radicular pelo nematoide. Os autores sugerem ainda que o aumento de terpenoides nas plantas resistentes é o acúmulo de fitoalexina, compostos tóxicos aos nematoides e que está diretamente relacionada com a reação de hipersensibilidade, isso ocorre em resposta à infecção.

Veech & McClure em 1977, pode observados quando um derivado de gossipol, não diferiu entre os genótipos, aos 8 dias após a infecção, já que a planta ainda estava em estágio inicial de desenvolvimento e o nematoide provavelmente ainda não tinha estabelecido seu sítio de alimentação. Já aos 24 dias após a inoculação a planta já estava mais desenvolvida e o nematoide estava bem estabelecido, quase completando seu ciclo biológico. Nessa fase foi percebido maior concentração de gossipol na cultivar resistente. As demais substâncias retidas nos picos P4, P6, P9 e P10 se apresentaram em maior concentração na cultivar suscetível FiberMax 966.

A substância retida em P9, derivado de gossipol, apresentou o mesmo comportamento aos oito dias após a inoculação. A interação entre cultivares e inoculação mostrou que as substâncias retidas em P3 e P4 estão em maior quantidade na cultivar suscetível FiberMax 966 quando inoculada com *M. incognita* (Tabela 4.5). Provavelmente estas substâncias não estão relacionadas a resistência do algodoeiro ao nematoide *Meloidogyne incognita*, raça 3. Pois o aumento da produção desses compostos não é um mecanismo da planta para se defender já que esta cultivar é sabidamente suscetível.

Tabela 4.4 Porcentagem de substâncias fenólicas quantificadas por CLAE, em algodoeiro resistente (TX 25) e suscetível (FiberMax 966) com tempo de retenção em minutos, aos 24 dias após a inoculação (DAI), Goiânia, 2013.

Genótipos	Picos (tempo de retenção em minutos) de substâncias fenólicas										
	1,39 ¹ P1 ²	1,92 P2	2,37 P3	3,90 P4	4,74 P5	5,31 P6	8,13 P7	9,45 P8	13,63 P9	16,60 P10	19,90 P11
TX 25	6,98a	1,30a	2,66a	2,13b	3,84a	3,12b	1,21a	5,55a	19,74b	15,23b	32,20a
FM966	6,52a	1,40a	3,26a	3,02a	3,25b	4,34a	1,91a	4,41b	24,55a	18,58a	23,72b
Fator (A)	0,5 ^{NS}	0,53 ^{NS}	5,52 ^{NS}	48,54*	8,15*	12,14*	1,13 ^{NS}	31,61*	18,77*	26,53*	323,32*
Inoculação											
Com	7,31a	1,42a	3,24a	2,46a	3,49a	3,40a	2,10a	5,01a	22,78a	16,27a	26,88b
Sem	6,52a	1,27a	2,68b	2,70a	3,60a	4,07a	1,03a	4,41a	21,50a	17,54a	29,04a
Fator (B)	3,03 ^{NS}	1,08 ^{NS}	4,92*	3,11 ^{NS}	0,33 ^{NS}	3,7 ^{NS}	2,65 ^{NS}	0,09 ^{NS}	1,27 ^{NS}	3,80 ^{NS}	20,93**
F (A) x (B)	1,11 ^{NS}	1,21 ^{NS}	4,44*	4,92*	0,31 ^{NS}	7,51 ^{NS}	1,98 ^{NS}	2,26 ^{NS}	0,01 ^{NS}	2,29 ^{NS}	1,97 ^{NS}
CV	23,43	25,05	21,09	12,23	14,28	22,93	102,43	9,95	12,49	9,40 ^{NS}	4,13

¹ Tempo de retenção em minutos; ² P1 a P11: porcentagem de substâncias fenólicas. Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si. * Significativo a 5% pelo teste de Tukey; ^{NS} Não significativo a 5% pelo teste de Tukey;

Tabela 4.5 Interação entre genótipos resistente (TX 25) e suscetível (FiberMax 966) quando inoculados com *Meloidogyne incognita* raça 3 aos 24 DAI. Goiânia, 2013.

Genótipos	Pico 3		Pico 4	
	Com	Sem	Com	Sem
TX 25	2,6800 bA	2,6517 aA	2,1600 bA	2,1017 bA
FIBERMAX	3,8183 aA	2,7133 aB	2,7717 aB	3,2850 aA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si (Tukey 1%)

Aos 35 DAI os picos P2, P5, P7, P8, P9 e P10 diferiram estatisticamente entre cultivares. As substâncias retidas em P2, P5, P7 e P8, apresentaram maior concentração no genótipo resistente (Tabela 4.5), sugerindo que esses metabólitos possam estar relacionados a resistência do genótipo TX 25, ao *M. incognita*. Esse resultado é interessante porque mostra que o flavonoide glicosilado retido no P5 se apresentou em maiores concentrações desde os 24 DAI e repetiu esse comportamento aos 35 DAI. Inferindo que esse metabólito pode estar relacionado com a resistência, pois, Adegbite & Adesiyun, (2005) afirmam que flavonoides isoladamente ou em combinação com outros metabólitos secundários apresentam efeito nematocida inibindo a eclosão e conferindo mortalidade aos nematoides. Quando estes compostos são produzidos tardiamente, aos 24 DAI, como ocorreu no genótipo estudado na presente pesquisa, a primeira geração do nematoide já está completando seu ciclo, assim não se consegue diminuir a taxa de inóculo inicial na área, mas reduz a taxa de infecção da doença. Essa variação comportamental ocorridas com a substâncias retidas no P5 podem ser explicadas porque os compostos secundários estão sujeitos a sofrer alterações devido ao meio Hedin et al. (1984).

A substância expressa no P7 diferiu estatisticamente quanto aos genótipos, com concentração maior no genótipo TX 25 (Tabela 4.5), repetindo o comportamento observado aos oito DAI. De todos os compostos identificados na cromatografia, essa substância sete foi a que mais se destacou quanto à porcentagem produzida no genótipo resistente e no suscetível. Aos oito DAI a concentração foi 13% a mais no TX 25 que no FiberMax 966 (Tabela 4.2) e aos 35 DAI essa diferença aumentou para 31% (Tabela 4.5). E pelos resultados essa substância está presente no sistema radicular do algodoeiro independente da presença ou não do nematoide, indicando ser um mecanismo de resistência bioquímico pré-formado.

O flavonóide glicosilado retido no P8 se comportou da mesma forma em todos os períodos de avaliação aos 8, 24 e 35 DAI. Apresentando sempre em maiores concentrações no genótipo resistente. Nesse caso, o composto parece não ter sofrido alterações com o meio. Esse comportamento leva a sugerir que esse flavonoide pode estar relacionado a resistência do genótipo TX 25 a *M. incognita*. Compostos fenólicos, no geral, tem sido frequentemente associado a resistência a *M. incognita*, e em alguns casos na comparação entre cultivar resistente e suscetível, tem demonstrado que a concentração desses compostos são maiores nas cultivares resistentes, mesmo antes da presença do nematoide (Huang 1985). Em outro estudo Shakil et al. (2008) relataram o isolamento e, identificação de dois novos flavonoides prenilados de *Phyllanthus niruri* L., com atividade nematicida contra *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *Rotylenchulus reniformis* (Linford & Oliveira), sendo que um dos compostos, apresentou atividade contra *R. reniformis* semelhante ao nematicida carbofuran (DL₅₀ 3,3 e 3,1 g/mL, respectivamente). Mostrando claramente a toxicidade desse composto aos nematoides.

Analisando a interação entre genótipos e inoculação aos 35 DAI (Tabela 4.6), nota-se que no P6, não houve diferença entre os genótipos e sim entre a presença ou não do nematoide, no genótipo resistente, apresentando maior concentração nas plantas não inoculadas. Já a interação referente ao P8 e P11 (Tabela 4.6), foi observado diferença entre os genótipos e quanto a presença ou não do nematoide na planta. Assim observa que nos dois casos houve maior concentração das substâncias, flavonoides glicosilados e derivado de gossipol, respectivamente, no genótipo resistente, quando este era incitado pelo nematoide. Esse resultado confirma os obtidos nos demais períodos de avaliação, quando estes compostos se apresentaram em maior concentração nos genótipos resistentes, reforçando a hipótese de que estão relacionados a resistência bioquímica do TX 25. Os resultados da presente pesquisa são reforçados pela teoria de Veech, (1977), de que o algodoeiro aumenta a produção desses metabólitos a medida que a planta se desenvolve e a medida que o nematoide estabelece seu sítio de alimentação. Assim a produção de flavonoides e gossypol, também é concentrada nos locais de maior infecção pelo nematoide, ou seja, nas células gigantes, células nutridoras do nematoide. Uma vez essas células estando comprometidas, compromete-se também a alimentação e o desenvolvimento do nematoide, diminuindo assim a população. Essa toxicidade dos flavonoides aos nematoides está relacionada diretamente com a produção de fitoalexina.

Tabela 4.6 Porcentagem de substâncias fenólicas quantificadas por CLAE, em algodoeiro resistente (TX 25) e suscetível (FiberMax 966) com tempo de retenção em minutos, aos 35 dias após a inoculação (DAI), Goiânia, 2013.

Genótipos	Picos (tempo de retenção em minutos)										
	1,39	1,92	2,37	3,90	4,74	5,31	8,13	9,45	13,63	16,60	19,90
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
TX 25	5,96a	1,36a	2,90a	2,18a	2,82a	2,70a	2,33a	4,91a	24,57b	16,7b	27,63a
FM966	5,14a	1,12b	3,37a	1,98a	1,95b	2,16a	0,74b	3,99b	31,15a	18,05a	25,71a
Fator (A)	4,28 ^{NS}	6,78*	3,24 ^{NS}	2,74 ^{NS}	7,03*	4,17 ^{NS}	10,49*	27,35*	20,09	4,71*	2,14 ^{NS}
Inoculação											
Com	6,24a	1,27a	3,31a	2,22a	2,35a	2,82a	1,96a	4,27a	27,01a	17,71a	25,63a
Sem	4,86b	1,20a	2,97a	1,94b	2,42a	2,06b	1,11a	4,48a	28,71a	17,03a	27,71a
Fator (B)	11,78*	0,63 ^{NS}	1,76 ^{NS}	5,07*	0,43 ^{NS}	8,96*	2,99 ^{NS}	0,009 ^{NS}	1,33 ^{NS}	1,21 ^{NS}	12,50 ^{NS}
F (A) x (B)	2,68 ^{NS}	1,48 ^{NS}	0,0012 ^{NS}	13,94*	0,000 ^{NS}	0,009	3,02 ^{NS}	51,69*	2,7 ^{NS}	4,15 ^{NS}	4,60*
CV	17,63	17,7 ^{NS}	20,29	14,42	33,68	25,50	78,37	9,59	12,90	8,77	12,07

¹ Tempo de retenção em minutos; ² P1 a P11: porcentagem de substâncias fenólicas. Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si. * Significativo a 5% pelo teste de Tukey; ^{NS} Não significativo a 5% pelo teste de Tukey;

Tabela 4.7 Interação entre genótipos resistente (TX 25) e suscetível (FIBERMAX 966) quando inoculados com *Meloidogyne incognita* raça 3 aos 35 DAI. Goiânia, 2013.

Genótipos	Inoculação									
	Pico 4		Pico 5		Pico 6		Pico 8		Pico 11	
	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
TX 25	2,0967 aA	2,2783 aA	2,7867 aA	2,8567 aA	3,0767 aA	2,3233 aB	5,5100 aA	4,3100 aB	28,0050 aA	27,2667 aA
FIBERMAX 966	2,3517 aA	1,6167 bB	1,9183 aA	1,9850 aA	2,5650 aA	1,7967 aB	3,3450 bB	4,6517 aA	23,2617 bB	28,1600 aA

Médias seguidas pela mesma letras maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si (Tukey 1%);

Em síntese os gráficos plotados na cromatografia mostram o comportamento bioquímico do algodoeiro resistente, TX 25 (Figura 4.4 A-F) e do suscetível (Figura 4.5 A-F), inoculados e não inoculados. O eixo x mostra o tempo de retenção ou tempo de leitura dos picos, que variou de 1,39 minutos a 19,90 minutos (Figura 4.4 A-F). O eixo y mostra a absorbância das substâncias que variou de 0 a 40 UA, mostrado no gráfico com intervalo de 5 em 5 UA (Figura 4.4 A-F). No genótipo FiberMax 966 o eixo y variou de 0-20 UA, aos 8 DIA em plantas não inoculadas (Figura 4.5 A), e de 0-15 aos 8 DIA em plantas inoculadas (Figura 4.5 B). Aos 24 DAI, a variação foi de 0-40 UA nas plantas não inoculadas (Figura 4.5 C) e de 0-30 UA nas plantas inoculadas (Figura 4.5 D). Aos 35 DAI, a variação foi de 0-30 UA nas plantas não inoculadas e inoculadas. Entretanto nas não inoculadas o intervalo foi de 10 em 10 (Figura 4.5 E) enquanto que nas inoculadas o intervalo foi de 5 em 5 UA. No genótipo TX 25, a variação no eixo y foi de 5 em 5 UA. Aos 8 DAI foi de 0 a 20 UA, em plantas não inoculadas e de 0-30 UA, nas plantas inoculadas. Aos 24 DAI, a variação foi de 0 a 30 UA em plantas não inoculadas e de 0 a 40 em inoculadas. E aos 35 DAI a variação foi 0 a 30 UA, tanto para inoculadas, quanto para não inoculadas. Esses valores de absorbância indicam a concentração das amostras, quanto maior o valor da absorbância, maior a concentração da amostra.

As substâncias quantificadas por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H), e os respectivos sinais foram: sacarose $\delta = 5,39$ ppm (1H, d, $J = 3,8$ Hz), α -glicose $\delta = 5,10$ ppm (1H, d, $J = 3,7$ Hz), β -glicose $\delta = 4,47$ ppm (1H, d, $J = 7,7$ Hz), colina $\delta = 3,21$ ppm (9H, s), ácido málico $\delta = 2,94$ ppm (2H, dd, $J = 3,3$ e 17 Hz), ácido succínico $\delta = 2,66$ ppm (4H, s), unidade hemigossipol metoxilada $\delta = 1,62$ -1,58 ppm (6H, d, $J = 7,2$ Hz), unidade hemigossipol não metoxilada $\delta = 1,57$ -1,50 ppm (6H, m).

Na avaliação de oito dias após a inoculação foi identificado, no genótipo TX 25 maior concentração de sacarose, β glicose e hemigossipol metoxilado (Tabela 7). Nessa avaliação a sacarose apresentou concentração de 40,7% a mais em TX 25, em comparação com FiberMax 966. Para β glicose essa concentração em TX 25 foi ainda mais acentuada, 51% a mais FiberMax 966 (Tabela 4.7). McClures (1971), trabalhando com cultivares de algodão resistente e suscetível a *M. incognita* também encontrou maior quantidade de sacarose na cultivar resistente, enfatizando que os açúcares estão diretamente relacionados à resistência. Segundo Vidhyasekaran (1988), os principais patógenos que estão

relacionados com teores de açúcares ou são necrotróficos ou biotróficos, como é o caso do *M. incognita*.

Hemigossipol metoxilado também apresentou concentração de 59,4% a mais em TX 25 que no genótipo suscetível, FiberMax966. Esse resultado contradiz aqueles encontrados por Hedin et al. (1984), que não observaram diferença significativa entre genótipos resistentes e suscetíveis para esse metabólito. Contudo, observaram diferença entre plantas inoculadas e não inoculadas, sendo que as primeiras apresentam maior concentração desse composto. Hemigossipol é um tipo de gossipol que ocorre naturalmente no algodoeiro e que é considerado tóxico para vários patógenos e pragas (Stinopanovic et al., 1988). Estudos mostram que este composto está presente em quantidades notáveis em *Gossypium barbadense* e é relacionado diretamente com o processo de resistência a *Meloidogyne incognita* (Veech, 1978).

O interesse por estudos bioquímicos em algodão não é recente. Mace et al. (1974), estudando raízes de plântulas de algodão, encontraram quatro aldeídos terpenóides, além de gossipol. Dois destes foram descritos como aldeídos sesquiterpeno, hemigossipol e methoxyhemigossipol (Maxwell et al., 1972).

Tabela 4.7 Metabólitos quantificados por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (mg/g de raiz seca) em raiz de algodoeiro resistente, TX 25 e suscetível, FiberMax 966, aos oito dias após a inoculação. Goiânia, 2013.

Genótipos	Sacarose	α glicose	β glicose	colina	ác. mal ¹ .	ác.succ.	hemig. Met	hemig.não met
TX 25	14,05a	2,36a	4,66a	0,116a	0,000b	0,24a	7,20 ^a	24,95a
FM966	5,7b	1,95a	2,15b	0,101a	0,068a	0,34a	4,28b	21,59a
FA	26,67**	0,77 ^{NS}	12,84**	0,16 ^{NS}	13,55**	0,705 ^{NS}	14,26**	1,92 ^{NS}
Inoculação								
Com	10,09a	2,43a	3,42a	0,07a	0,015a	0,20a	5,28 ^a	20,80 a
Sem	10,05a	1,89a	3,39a	0,14a	0,053a	0,376a	6,30 ^a	25,71 a
FB	0,0005*	1,39 ^{NS}	0,001 ^{NS}	3,38 ^{NS}	4,26 ^{NS}	0,811 ^{NS}	1,84 ^{NS}	4,18 ^{NS}
F(A) x (B)	0,173 ^{NS}	1,73 ^{NS}	0,156 ^{NS}	1,23 ^{NS}	4,26 ^{NS}	0,111 ^{NS}	0,01 ^{NS}	1,09 ^{NS}
CV %	29,12	36,84	35,53	58,65	94,08	74,01	22,35	17,86

¹Ác. mal: ácido málico; Ac. succ: ácido succínico; hemig.met; hemigossipol metoxilado; hemig.não met.=hemigossipol não metoxilado. Letras minúsculas iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si. * (Tukey 1%);

Hemigossipol e metoxihemigossipol constituem a maior parte na formação das fitoalexinas presentes no tecido de algodoeiro resistente de *G. barbadense*. Com base nas informações da literatura e nos resultados da presente pesquisa, infere-se que esses hemigossipol metoxilado estejam relacionados a resistência do algodoeiro a *M. Incognita*. Contudo poucos desses estudos relacionam metabólitos com a presença de fitonematoides.

Além disso, esses compostos secundários são muito instáveis e facilmente sofrer alterações, perdendo suas características originais de conferir resistência.

Aos 24 DAI nenhuma substância quantificada apareceu em maior concentração no genótipo resistente TX 25 (Tabela 4.8). Essas substâncias podem ser produzidas em maiores concentrações no algodoeiro resistente no início do seu desenvolvimento, para garantir maior proteção à planta, impedindo a penetração do nematoide. Posteriormente, sua produção pode ser estabilizada, mantendo-se próximo aos valores encontrados no algodoeiro suscetível, FiberMax 966. Já no final do ciclo do nematoide, aos 35 dias (Tabela 4.9), o algodoeiro resistente volta a produzir açúcares, sacarose, em maior quantidade para impedir a reinfestação ocasionada pela eclosão de juvenis de segundo estágio. Esse aumento na concentração de sacarose pode ser observado com 25% a mais no genótipo resistente TX 25 que no suscetível, FiberMax 966 (Tabela 4.9). Com isso pode-se diminuir a taxa de doença na área. Se a cada 35 dias a produção do metabólito for suficiente para diminuir a população do nematoide no solo e no sistema radicular, até o final do ciclo do algodoeiro, por volta de 150 dias, a população do nematoide pode ser reduzida, talvez, a valores abaixo do nível de controle. Assim, pode ser que esse mecanismo presente no genótipo TX 25 seja o responsável ou contribua para a redução populacional de *M. incognita* em genótipo resistente.

Tabela 4.9 Metabólitos quantificados por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (mg/g de raiz seca) em raiz de algodoeiro resistente, TX 25 e suscetível, FiberMax 966, aos 24 dias após a inoculação. Goiânia, 2013.

Genótipos	Sacarose	α glicose	β glicose	colina	ác. málico ¹	ác.succínio	hemig. met	Hemig.não met
TX 25	12,35a	0,88b	1,24b	0,18a	0,81a	0,01a	4,90a	19,63b
FM966	11,02a	2,24a	2,73a	0,26a	1,21a	0,03a	5,49a	31,93a
F(A)	0,72 ^{NS}	8,08*	9,01*	2,49 ^{NS}	3,38 ^{NS}	3,81	1,22 ^{NS}	20,09**
Inoculação								
Com	11,31a	1,63a	2,11a	0,23a	0,83a	0,02a	5,09a	26,32a
Sem	12,06a	1,49a	1,89a	0,22a	1,19a	0,02a	5,31a	25,25a
F(B)	0,23 ^{NS}	0,79 ^{NS}	0,244 ^{NS}	0,03 ^{NS}	2,97 ^{NS}	0,15 ^{NS}	0,17 ^{NS}	0,15 ^{NS}
F(A) x (B)	0,827 ^{NS}	0,09 ^{NS}	1,36 ^{NS}	0,36 ^{NS}	4,19 ^{NS}	2,05 ^{NS}	0,25 ^{NS}	0,31 ^{NS}
CV%	23,02	53,17	43,29	42,26	35,16	85,83	17,79	18,42

¹Ác. má: ácido málico; Ac. succ: ácido succínico; hemig.met: hemigossipol metoxilado; hemig.não met.=hemigossipol não metoxilado. Letras minúsculas iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si. * (Tukey 1%);

Em nenhuma das três épocas avaliadas observou-se diferenças entre plantas inoculadas e não inoculadas, na produção de metabólitos quantificáveis por RMN ¹H

(Tabelas 4.8, 4.9 e 4.10). Isto sugere um mecanismo de resistência pré-formado, pois, quando o nematoide inicia o processo de infecção esses metabólitos já estão presentes na planta, conferindo alguma proteção.

Tabela 4.10 Metabólitos quantificados por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (mg/g de raiz seca) em raiz de algodoeiro resistente, TX 25 e suscetível, FiberMax966, aos 24 dias após a inoculação. Goiânia, 2013.

Genótipos	Sacarose	α glicose	β glicose	colina	ác. málico ¹	ác.succínio	hemig. met	Hemig.não met
TX 25	15,74a	1,16a	1,35a	0,18b	0,15a	0,013a	4,38a	17,77a
FM966	4,02b	1,17a	1,04a	0,40a	0,96a	0,008a	3,50a	19,54a
FA	12,574**	0,0009*	0,89 ^{NS}	161,65**	0,16 ^{NS}	0,75 ^{NS}	4,07 ^{NS}	0,51 ^{NS}
Inoculação								
Com	9,48a	1,10a	1,01a	0,13a	0,10a	0,011a	3,59a	16,57a
Sem	10,28a	1,23a	1,39a	0,09b	0,14a	0,010a	4,28a	20,73a
FB	0,05 ^{NS}	0,33 ^{NS}	1,29 ^{NS}	10,79*	0,08 ^{NS}	0,08 ^{NS}	2,50 ^{NS}	2,83 ^{NS}
F(A) x (B)	0,30 ^{NS}	0,063 ^{NS}	2,89 ^{NS}	10,79*	1,08 ^{NS}	0,08 ^{NS}	1,70 ^{NS}	0,008 ^{NS}
CV%	57,92	33,42	47,52	17,70	200,07	92,31	19,16	22,94

¹Ác. má:ácido málico; Ac. succ: ácido succínico; hemig.met: hemigossipol metoxilado; hemig.não met.=hemigossipol não metoxilado. Letras minúsculas iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si. * (Tukey 1%);

Observando a figura 4.4, referente a concentração de sacarose no genótipo resistente TX 25 e FiberMax 966, ambos inoculados e não inoculados com *M. incognita*, raça 3, percebe-se claramente que esse açúcar esteve presente nos dois genótipos. No genótipo FiberMax 966 o comportamento desse açúcar foi similar tanto para as plantas inoculadas, quanto não inoculadas. Se apresentou em maior concentração aos oito dias após a inoculação e decresceu ao longo do tempo. Aos 35 DAI, reduziu em cerca de três vezes a concentração inicial (Figura 4.4).

Analisando ainda a sacarose no genótipo resistente TX 25 inoculado e não inoculado com *M. incognita* raça 3 (Figura 4.4), observou-se um comportamento totalmente diferente do observado no genótipo suscetível FiberMax 966. No TX 25, a concentração de sacarose aos oito DAI, era menor, aos 24 DAI, manteve-se praticamente constante, com uma pequena redução, contudo não diferiu estatisticamente (Tabela 4.9). Aos 35 DAI foi observado um aumento significativo na concentração desse composto no genótipo TX 25. Assim como, no genótipo suscetível, no genótipo TX 25, também o comportamento da produção de sacarose foi semelhante nas plantas inoculadas e não inoculadas. Assim, fica claro que essa substância pode está relacionada diretamente com a

resistência do algodoeiro a *M. incognita* raça 3, essa conclusão fica evidente ao observar as curvas plotadas no gráfico da figura 4.4.

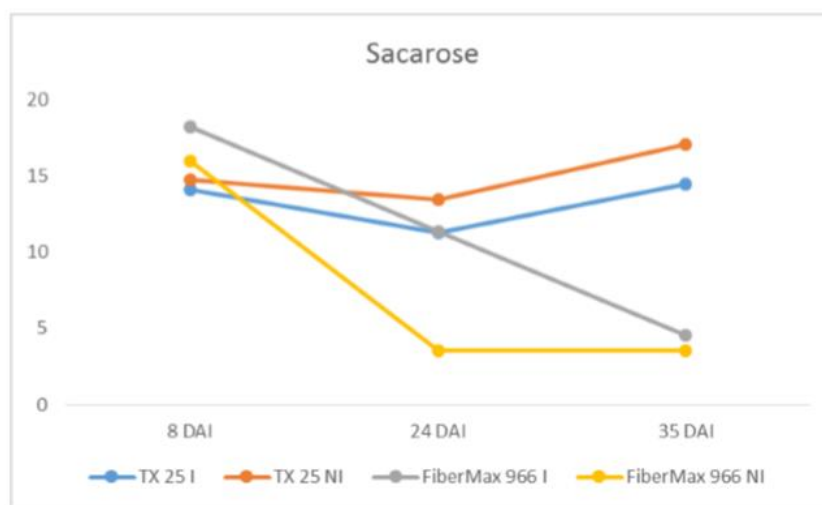


Figura 4.4 Concentração de sacarose em mg/grama de raiz seca em genótipo de algodoeiro resistente TX 25, e suscetível FiberMax966 inoculado (I) e não inoculado (NI) com *Meloidogyne incognita* raça 3.

Analisando a figura 4.5, referente a concentração de α glicose em genótipos de algodoeiro resistente TX 25 e o suscetível FiberMax 966, nota-se um comportamento interessante desta substância. Não diferiu quanto a inoculação do genótipo, contudo diferiram quanto ao genótipo. Analisando as curvas do gráfico percebe-se que no genótipo resistente TX 25, a α glicose aos oito DAI, estava em uma concentração maior. Após esse período a concentração diminuiu drasticamente e, posteriormente voltou a aumentar a concentração, contudo, de forma discreta.

O genótipo suscetível se comportou de forma inversa (Figura 4.5), aos oito DAI, estava em uma concentração intermediária, apresentou um aumento discreto. Aos 24 DAI e aos 35 DAI, decresceu, praticamente na mesma concentração nas plantas inoculadas e não inoculadas dos dois genótipos. Este resultado sugere que esta é uma substância que pode sim estar relacionada a resistência. Pois no estágio inicial a planta produz uma quantidade maior desse açúcar e à medida que o nematoide vai se estabelecendo no sistema radicular a concentração deste açúcar diminui. Comportamento semelhante foi observado ao analisar β glicose (Figura 4.6), diferindo apenas aos 35 DAI, quando o TX 25 não inoculado apresentou concentração mais elevada. Este resultado sugere que α glicose e a β

glicose podem estar relacionadas a resistência por garantir uma proteção inicial ao algodoeiro.

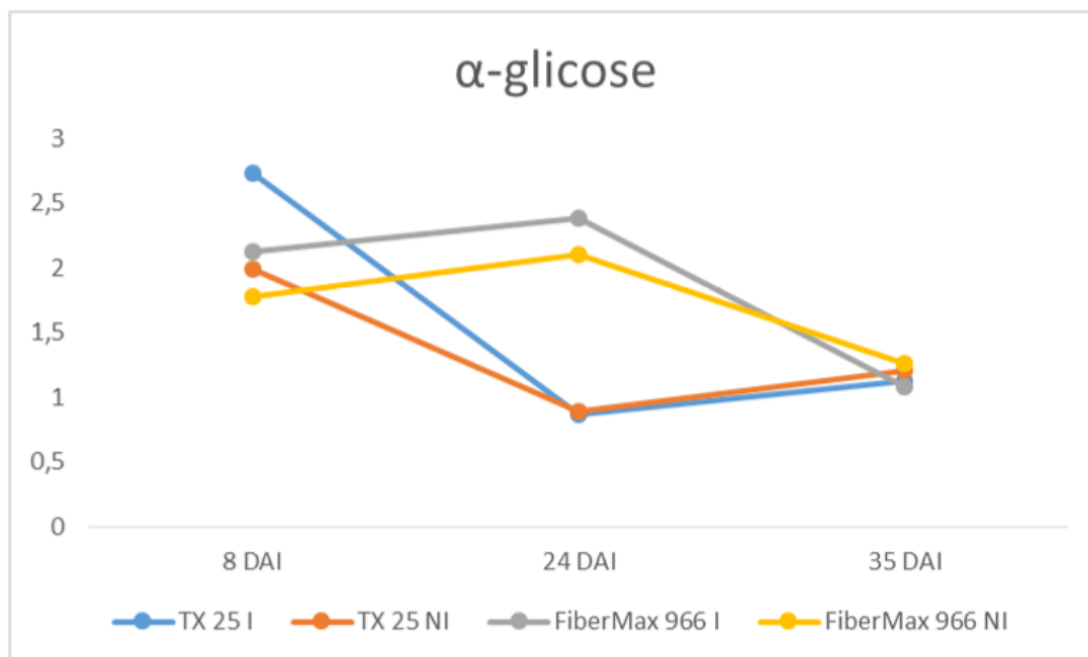


Figura 4.5 Concentração de α glicose em mg/grama de raiz seca em genótipo de algodoeiro resistente TX 25, e suscetível FiberMax966 inoculado (I) e não inoculado (NI) com *Meloidogyne incognita* raça 3.

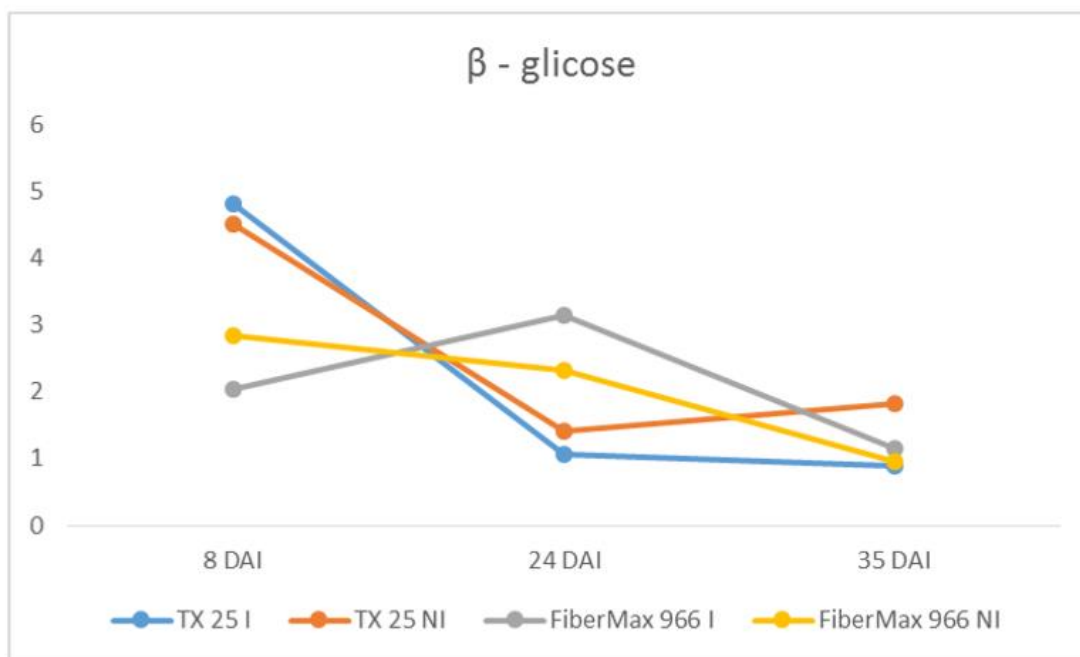


Figura 4.6 Concentração de β glicose em mg/grama de raiz seca em genótipo de algodoeiro resistente TX 25, e suscetível FiberMax966 inoculado (I) e não inoculado (NI) com *Meloidogyne incognita* raça 3.

O hemigossipol metoxilado (Figura 4.7) apresentou resultados inversos nos dois genótipos avaliados, apresentando comportamento similar dentro do genótipo, quanto a presença ou não do nematoide. Ao comparar as plantas de TX 25 inoculadas e não inoculadas, nota-se que as plantas não incitadas pelo patógeno apresentaram maior concentração desse composto. O pico máximo da concentração do hemigossipol metoxilado é aos oito dias após a inoculação, depois começa a decrescer. Esse comportamento sugere que este composto garante uma proteção inicial ao algodoeiro. Esta hipótese pode ser melhor elucidada, quando se observa o genótipo FiberMax 966, que apresenta concentração baixa aos oito dias após a inoculação, tende a aumentar aos 24 DAI e volta a decrescer aos 35 DAI. Enfatizando que o TX 25 produz o hemigossipol metoxilado em concentração mais elevada no início do desenvolvimento da planta, garantindo que está esteja protegida do ataque de *M. incognita* raça 3 (Figura 4.7).

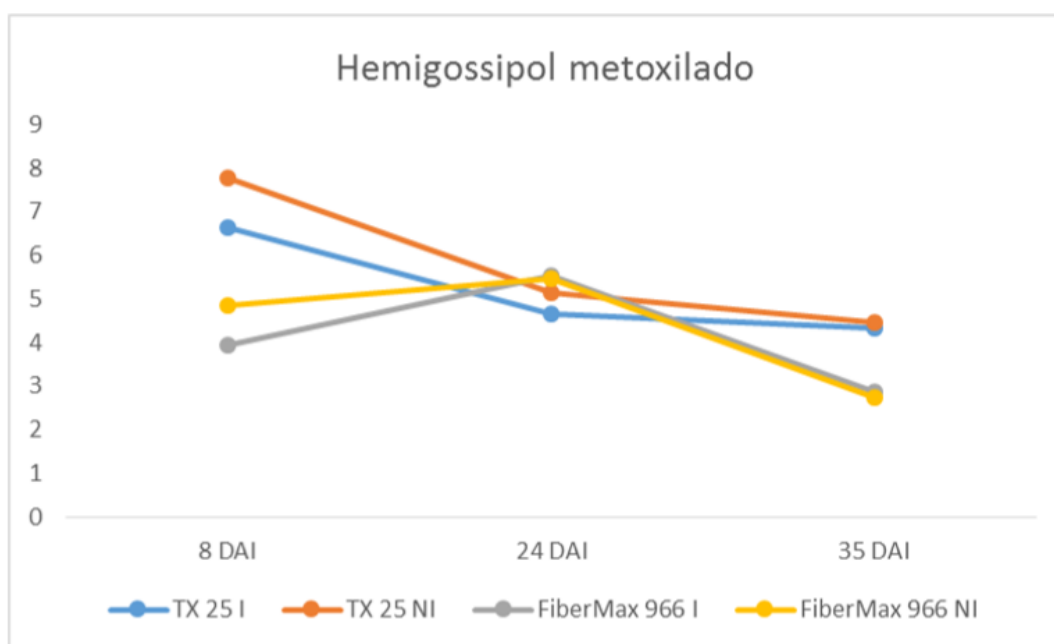


Figura 4.7 Concentração de hemigossipol metoxilado em mg/grama de raiz seca em genótipo de algodoeiro resistente TX 25, e suscetível FiberMax966 inoculado (I) e não inoculado (NI) com *Meloidogyne incognita* raça 3.

4.4 CONCLUSÕES

O genótipo de algodão TX 25 apresenta em sua composição química:

- Um metabólito não identificado (P7), que pode estar relacionado com a resistência bioquímica pós-formada ao *Meloidogyne incognita* raça 3;
- Um derivado de gossipol (P8) que pode ser capaz de garantir resistência bioquímica pós-formada a *M. incognita*;
- Flavonóides glicosilados (P5) e sacarose, pode estar relacionado a resistência a *M. incognita*,
- β glicose, hemigossipol metoxilado pode garantir proteção inicial ao genótipo estudado.

5 HERANÇA DA RESISTÊNCIA DE ALGODOEIRO A *Meloidogyne incognita*, RAÇA 3

RESUMO

O objetivo do trabalho foi estudar a herança da resistência de *Gossypium hirsutum* a *Meloidogyne incognita* raça 3. Foram utilizados acessos de *Gossypium* sp. pertencentes aos bancos de germoplasma da Embrapa Algodão. Foram realizados dois experimentos em dois anos consecutivos. No primeiro ano foram testados: FiberMax 966 e TX 25 como parentais suscetíveis e resistentes respectivamente. E a geração F₁, F₂ e retrocruzamento. No segundo experimento, os parentais foram os mesmos e acrescentou-se o genótipo M315 como resistente e os genótipos LA887 e DeltaOpal, de comportamento intermediário. Neste segundo experimento foram avaliados a geração F₂. Em ambos os experimentos as avaliações ocorram aos 120 dias após a inoculação, e avaliou-se índice de galhas, índice de massa de ovos e fator de reprodução. Nos dois experimentos o genótipo FiberMax 966 comportou-se como suscetível, e o TX 25, como resistente. No primeiro experimento a geração F₁ e retrocruzamento se mostraram como suscetíveis, no segundo experimento as testemunhas M315 se mostrou resistente, LA887 e DeltaOpal como moderadamente resistentes. A geração F₂ nos dois experimentos apresentou resultados semelhantes. A geração F₂ apresenta resistência de caráter oligogênico.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum*, genótipo TX 25, segregação gênica

ABSTRACT

This research aimed to study the inheritance of resistance of *Gossypium hirsutum* resistance inheritance to *Meloidogyne incognita* race 3. Experiments were conducted using accessions of *Gossypium* spp. from the genebanks of Embrapa Cotton. Two experiments were conducted in two consecutive years. In the first year were tested FiberMax 966 and TX 25 as susceptible and resistant parents respectively. F₁, F₂, and backcross generation. In the second experiment, the parents were the same and added the M315 genotype as sturdy and LA887 and DeltaOpal genotypes intermediate behavior. In this second experiment, were study the F₂ generation. In both experiments the evaluation occur at 120 days after inoculation, and it was evaluated gall index, egg mass index and reproduction

factor. In both experiments genotype FiberMax 966 behaved as susceptible, TX and 25 as resistant. In the first experiment the F₁ backcross generation and proved as susceptible in the second experiment the M315 witnesses proved to be resilient, and LA887 DeltaOpal as moderately resistant. The F₂ generation in both experiments showed similar results. The F₂ generation shows resistance oligogenic character.

Key words: *Gossypium hirsutum*, genotype TX 25, gene segregation

5.1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem hoje uma área plantada com algodão de 1.074,2 hectares, sendo que a região Centro-Oeste registrou na safra 2013/2014, 680,2 mil hectares cultivados com esta cultura. A produção brasileira de algodão em pluma é de 1.260,6 toneladas, sendo a região central do Brasil a maior produtora, com 824,8 mil toneladas. Nesse cenário o estado do Mato Grosso se destaca tanto com a maior área plantada, como com a maior produção. Contudo a maior produtividade está no estado de Goiás, com 1.631 kg ha⁻¹, superando a média da região Centro-Oeste, que é de 1.515 kg ha⁻¹, e até mesmo a média nacional de 1521 kg ha⁻¹ (Conab, 2013).

Apesar das elevadas produtividades, os cotonicultores sofrem com a presença de fitonematoides nas lavouras, e o Estado de Goiás está entre os estados produtores que apresentam maiores índices desses patógenos (Iamamoto, 2003). Existem três espécies que são consideradas nematoides-chave do algodoeiro: *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919, Chitwood, 1949.), *Rotylenchulus reniformis* (Linford & Oliveira, 1940) e *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Sch. Stekhoven, 1941 (Inomoto et al., 2006). Galbieri et al. (2008), avaliando a resistência de 22 genótipos de algodão a *M. incognita* observaram que 21 deles permitiram a multiplicação do nematoide. As perdas na produção nos genótipos mais afetados chegaram a 65% quando comparado com os genótipos resistentes.

O uso de cultivares resistentes é o método de controle mais econômico ao produtor, pois não acarreta ônus à produção, não interfere no meio ambiente e não causa desequilíbrio ambiental (Boiça Junior et al., 2008). Logo, a resistência genética é a prática mais segura para redução dos prejuízos causados à cultura por *M. incognita* (Lordello, 1992). No Brasil, contudo, ainda não há variedades que associam boas características agronômicas e índices de resistência a esse nematoide, o que torna importante a

identificação e caracterização de fontes de resistência e sua incorporação em germoplasmas melhorados.

Cultivares de algodão moderadamente resistentes ao nematoide das galhas já foram identificadas, mas não são utilizadas em escala comercial devido ao seu baixo potencial agrônomo ou à sua área restrita de adaptação (Ogalló et al., 1997). Nos Estados Unidos, três cultivares comerciais apresentam moderado nível de resistência a *M. incognita*, sendo que Acala NemX, primeira fonte de resistência, considerada apenas moderadamente resistente, tornou-se cultivar comercial. A cultivar Clewilt 6, segunda fonte de resistência, também moderadamente resistente, tornou-se cultivar comercial. Por fim, a terceira fonte de resistência, Will Jack Jones, não se tornou uma cultivar comercial, embora tenha originado a cultivar Auburn 623 (cruzamento entre Clewilt 6 x Will Jack Jones), que se apresentou como altamente resistente (Shen et al., 2006). Posteriormente, vieram as cultivares comerciais Stoneville LA887 e Paymaster 1560, ambas originadas da segunda fonte de resistência. Dessas três fontes, apenas a Acala NemX continua sendo utilizada pelos cotonicultores americanos; as demais são consideradas cultivares obsoletas em razão das suas características agrônomicas não atenderem os padrões de produtividade e qualidade do mercado atual (Robinson et al., 2001).

No Brasil, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) lançou como material resistente a cultivar IAC 20, material originário do cruzamento entre Auburn 56, resistente ao complexo nematoide e *Fusarium* sp., e GH 11-9-75 (Carneiro et al., 2005). A cultivar foi lançada em 1983 e cultivada até 1996 (Cia et al., 2001). Posteriormente, o IAC lançou 96/414, IAC 22 e IAC 23, todos os híbridos de IAC 20, conseqüentemente originados da fonte de resistência Auburn 56. Assim as fontes de resistência são escassas, com mecanismos de resistências semelhantes, logo, fáceis de serem suplantados (Fuzatto & Cia, 2001).

As cultivares citadas já estão em desuso no mercado e com número reduzido de genótipos resistentes e o aumento de áreas contaminadas com nematoides, especialmente *M. incognita*, tornam-se fundamentais estudos que visem identificar novas fontes de resistência e avaliar a possibilidade de introduzi-las em programas de melhoramento genético visando o desenvolvimento de novas cultivares. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o genótipo selvagem TX 25 em cruzamento com outro genótipo visando confirmar a sua resistência a *M. incognita*, bem como avaliar a herança desta resistência.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos utilizando-se acessos de *Gossypium hirsutum* pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Algodão, cujas espécies e origens estão apresentadas na Tabela 5.1. A cultivar FiberMax 966 foi escolhida como padrão de suscetibilidade, os acessos TX 25 e M315 como materiais resistentes; e o genótipo LA887 e a cultivar DeltaOpal como comportamento intermediário.

Tabela 5.1 Descrição dos genótipos de *Gossypium* sp. utilizados nos experimentos conduzidos em 2011 e 2012 quanto à origem, reação a *Meloidogyne incognita* raça 3. Goiânia, 2013.

¹Siglas: S - suscetível; R- resistente; MR - moderadamente resistente.

O inóculo de *M. incognita*, raça 3, foi proveniente de raiz de tomate (*Solanum*

Genótipo	Espécie/raça	Origem	Reação a <i>M. incognita</i>	Experimento	
				2011	2012
FiberMax 966	<i>G. hirsutum</i> raça latifolium	Cultivar comercial	S ¹	X	X
DeltaOpal	<i>G. hirsutum</i> raça latifolium	Cultivar comercial	MR		X
LA887	<i>G. hirsutum</i> raça latifolium	USA / Stoneville/ Cultivar comercial obsoleta	MR		X
M315	<i>G. hirsutum</i> raça latifolium	USA	R		X
TX 25	<i>G. hirsutum</i> raça punctatum	México/Acesso selvagem	R	X	X
F1	<i>G. hirsutum</i>	FiberMax 966 (♀) x TX 25(♂)	Desconhecido	X	
F2	<i>G. hirsutum</i>	FiberMax 966 (♀) x TX 25(♂)	Desconhecido	X	X
BC (Backcross)	<i>G. hirsutum</i>	F1 x FiberMax 966	Desconhecido	X	

lycopersicum) do grupo Santa Cruz, cultivar Santa Clara, cedida pelo laboratório de nematologia da Embrapa Recursos (Cenargen). A população foi oriunda de área de algodão naturalmente infestada em Londrina, Paraná. A identificação da espécie foi feita no Cenargen por meio do fenótipo das esterases (Carneiro & Almeida, 2001) e de marcador SCAR (sequence-characterized amplified region) (Randig et al., 2002). A raça foi determinada usando-se o teste com hospedeiros diferenciadores, de acordo com o método de Hartman & Sasser (1985).

Na Universidade Federal de Goiás, esse inóculo foi mantido em casa de vegetação por três meses, em tomateiro do grupo Santa Cruz, cultivar Kada, em vasos com substrato composto por mistura de solo, areia e substrato comercial (Germinar®) na proporção de 1:1:1. Este material foi previamente autoclavados a uma temperatura de 120°C e pressão de 1 kgf por vinte minutos. Ao final de noventa dias retirou-se a parte aérea das plantas e as raízes foram cortadas e trituradas em liquidificador, com água e hipoclorito de sódio (NaOCl a 0,5%) por um minuto, conforme Hussey & Barker (1973). A concentração de ovos foi determinada por contagem sob microscópio óptico, em aumento de 100x, com auxílio de câmara de Peters.

O primeiro experimento foi conduzido no período de junho a novembro de 2011, sob condições de casa de vegetação. Foram utilizados vasos plásticos com capacidade para 5,0 L preenchidos com solo, areia e substrato comercial, na proporção de 1:1:1 e mantidos sobre bancadas. Foi semeada uma semente por vaso e o experimento composto por vinte plantas BC (Retrocruzamento), sete plantas de F₁, duzentas plantas de F₂, sete plantas de TX 25, sete plantas FiberMax 966, dispostas em delineamento inteiramente casualizado. Quando as plantas apresentaram em torno de 20 cm a 30 cm de altura, em média aos vinte dias após a emergência, foi feita a inoculação de 5000 ovos e juvenis de segundo estágio, por planta, concentrados em 5 mL.

Durante o período de condução do experimento foram realizadas irrigações diárias e, também, adubações, com formulações contendo 15% de nitrogênio, 5% de fósforo, 10% de potássio, 1% de cálcio, 1% de magnésio e 3% de enxofre. Essa adubação foi realizada mensalmente aplicando-se 30 mL por planta e complementada com cloreto de potássio. Foram realizadas aplicações do inseticida cetoenol (Oberon®) na dose de 600 mL ha⁻¹ do produto comercial, visando o controle de mosca branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) e ácaro rajado (*Polyphagotarsonemus latus*). Foram necessárias duas aplicações, uma aos sessenta dias após a semeadura (DAS) e a outra aos cem DAS, em um volume de calda de 300 L ha⁻¹. Para controle de cochonilhas (*Planococcus* sp) foi aplicado 0,05% de óleo mineral, mais detergente, em um volume de calda 1000 L ha⁻¹ de calda, sempre aplicados no final da tarde, para evitar a queima das folhas pelo calor. Foram realizadas duas aplicações, uma aos sessenta DAS e a outra aos 67 DAS.

As avaliações foram realizadas aos 120 dias após a inoculação. As plantas foram retiradas dos vasos, e separando-se parte aérea e raízes. A parte aérea foi descartada e as raízes levadas para o laboratório de nematologia, onde foram lavadas e avaliadas para

a massa fresca das raízes. Em seguida, foram coradas com Phloxina B (Taylor & Sasser, 1978). Para essa coloração foram necessários 0,15 g do corante, dissolvido completamente em 1,0 L de água. Ficaram, então, imersas nesse corante por vinte minutos e, posteriormente, foram enxaguadas para retirada do excesso de corante.

Após a coloração foi avaliado índice de galhas e de massas de ovos de acordo com o método de Hartman & Sasser (1985): 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 se encontrado mais de cem galhas massas de ovos. O número total de ovos por planta foi avaliado também de acordo com método de Hussey & Barker (1973). O fator de reprodução (FR) de cada planta foi calculado dividindo-se o número total de ovos por planta (PF) pelo número de ovos inoculados (PI = 5000) (Oostenbrinck, 1966).

O segundo experimento foi conduzido no período de junho a novembro de 2012, também sob condições de casa de vegetação, sendo os tratamentos constituídos por cinco plantas FiberMax 966, cinco plantas de TX 25, cinco plantas de DeltaOpal, cinco plantas de M315 e cinco plantas de LA887. As cultivares DeltaOpal, LA887 e M315 foram acrescidas no estudo por terem comportamento conhecido em relação a *M. incognita* e, portanto, aumentar a confiabilidade dos resultados. O delineamento experimental utilizado foi em blocos aumentados de Federer (Federer, 1956), com seis blocos. Cada bloco foi constituído por 39 plantas, sendo 34 plantas F2, mais as testemunhas Delta Opal, FiberMax 966, LA887, M315 e TX 25. Nesse arranjo experimental, cada bloco tinha 34 plantas de comportamento desconhecido e cinco plantas de comportamento conhecido.

As sementes foram dispostas em sacos plásticos para mudas com capacidade para 2,0 L e o substrato preparado da mesma forma como no primeiro experimento (solo, areia e substrato na proporção 1:1:1). A condução do experimento desde a inoculação, os demais tratamentos culturais fitossanitários e as avaliações também foram realizadas conforme descrito para o primeiro experimento.

Os dados obtidos no primeiro ensaio foram submetidos à análise de Qui-quadrado de Pearson, com o objetivo de medir o grau de discrepância entre um conjunto de frequências observadas e o conjunto de frequências esperadas de acordo com uma hipótese proposta. Foi feito então, o teste de aderência ou de ajustamento para o qual se elaborou as seguintes hipóteses: herança com caráter monogênico, epistasia dupla recessiva e caráter oligogênico ou poligênico. Para isso foram testados as proporções 3S:1R, 1S:2MR:1R,

9S:7R e 9S:3MR:4S, sob o nível de significância de 5%. Em seguida, conclui com base no χ^2 se aceita ou rejeita as hipóteses propostas.

No segundo experimento a análise para Blocos Aumentados de Federer foi realizada no programa GENES (Cruz, 2006). Em ambos os experimentos foram plotados histogramas para melhor visualização do comportamento das plantas da geração F₂. Os dados usados para confeccionar o histograma foi o fator de reprodução. Para a confecção dos histogramas, os dados foram divididos em 14 classes, determinada pela regra de $K=\sqrt{n}$, onde K é o número de classes e n é o número de dados. Os genótipos da geração F₂ foram dividido em resistente, moderadamente resistente e suscetível, de acordo com o método de Starr e Mace (Starr & Mercer, 2009). Esse método propões que a reprodução do nematoide seja comparada com o padrão de suscetibilidade. E adota uma escala, em que, se a planta permitiu que o nematoide se multiplicasse de 0 a 25%, em relação ao padrão de suscetibilidade essa planta é considerada resistente; uma reprodução de 25 a 50% é classificada como moderadamente resistente e, se a planta permite uma reprodução de 50% ou mais em relação ao padrão de suscetibilidade esta planta é considerada suscetível.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento a cultivar FiberMax 966 confirmou sua suscetibilidade, apresentando elevado índice de galhas, índice de massa de ovos e fator de reprodução maior que 24 (Tabela 5.2). Indicando que o nematoide conseguiu se multiplicar nas raízes desse genótipo 24 vezes a mais que sua população inicial, caracterizando assim, alta suscetibilidade. Já o genótipo TX 25 apresentou baixo índice de galhas, de massa de ovos e o fator de reprodução menor que 1, indicando que ao final de 120 dias o nematoide não multiplicou. Pela classificação de Starr e Mercer (2009) este genótipo se mostrou altamente resistente. Apesar do conhecimento sobre a variabilidade genética do *M. incognita* e do surgimento de populações mais virulentas, esse genótipo se manteve resistente ao longo dos anos (Robinson et al., 2004), o que confirma seu potencial para ser introduzido em programas de melhoramento.

As plantas da geração F₁ se mostraram 100% resistentes, o índice de massa de ovos da geração foi inferior ao índice de galhas (Tabela 5.2), e a porcentagem de reprodução, quando comparadas com o padrão de suscetibilidade foi de 18,83% mostrando que a reprodução das fêmeas foi afetada. Já as plantas oriundas de retrocruzamento, se mostraram suscetíveis (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 Comportamento dos genótipos de algodoeiro testados quanto à média do índice de galhas (IG), índice de massa de ovos (IMO), fator de reprodução (FR), Porcentagem de redução do Fator de reprodução (% de redução FR). Goiânia, 2013.

Tratamento	IG	IMO	FR	% de redução FR
FM966	5,00	5,00	24,47	0%
TX 25	3,86	2,28	0,62	97,46%
F ₁	4,83	3,00	4,61	81,16%
RC	4,95	3,7	13,62	44,34%
F ₂	4,65	3,14	6,05	75,25%

Apresentaram elevado valor para índice de galhas e para índice de massa de ovos. E permitiu que o nematoide tivesse uma porcentagem de reprodução de 55,65%. Esse resultado já era esperado, pois a geração F₁ que deu origem a esse retrocruzamento foi retrocruzado com o parental suscetível. As plantas da geração F₂ permitiram porcentagem de reprodução 24,72%, confirmando ser resistência ao *Meloidogyne incognita*, raça 3 (Starr e Mercer, 2009).

De acordo com a primeira lei de Mendel ou lei da segregação, se a primeira geração ou geração F₁ é fenotipicamente igual a um dos genitores, significa que aquele genitor tem dominância em relação ao outro (Griffiths et al., 2011). A segregação na geração F₁ ocorre porque a característica da resistência no genitor TX 25 está associada a dois alelos e, durante a formação dos gametas as células haplóides formadas possuem apenas um dos alelos de cada par, ou seja, metade das informações do genitor TX 25 e metade das informações do genitor FiberMax 966. Considerando esses resultados nota-se que o genótipo TX 25 é dominante em relação ao FiberMax966, com 100% da geração F₁ resistente, há uma possibilidade de a resistência ser monogênica. Contudo, essa hipótese não pode ser confirmada, pois, pelo teste de Qui-quadrado (Tabela 5.3) todas as proporção testadas se mostraram não significativo. Esse fato pode ser explicado pelo fato da população de plantas da geração F₁ ser muito restrito. Sete plantas apenas, não é o suficiente para verificar o comportamento de uma geração. Logo, analisando apenas os resultados da geração F₁ não é possível descartar a ideia de herança monogênica.

Após o teste de aderência realizado foi observado que a segregação fenotípica em F₂ não se ajustou a proporção 3:1, nem tão pouco a proporção de 1S:2MR:1R, logo,

não caracteriza resistência de caráter monogênico (Tabela 5.3). A geração F₂ se ajustou a proporção 9R:3MR:4S, sugerindo herança de caráter oligogênico. Oliveira (2010) trabalhando com vários cruzamento de genótipos de algodoeiro, para verificar resistência a Ramulose, notou que a herança do caráter é oligogênico.

Tabela 5.3 Significância do teste χ^2 para padrões de segregação de plantas RC, F₁ e F₂, baseado no Fator de reprodução, admitindo um ou dois genes envolvidos no controle do caráter.

Cruzamento	3S:1R	1S:2MR:1R	9S:7R	9S:3MR:4R
RC				
F ₁	ns	ns	ns	ns
F ₂	ns	ns	ns	**

** significativo a 1% pelo teste χ^2 , ns: não significativo

A figura 5.1 mostra o comportamento da geração F₂, sendo, a maioria dos genótipos são classificados como resistentes, fator de reprodução de um a seis. Moderadamente resistente são os genótipos que apresentaram fator de reprodução variando de seis a doze e, genótipos suscetíveis são os que apresentaram valor de reprodução acima doze.

Os resultados do segundo experimento também confirmaram o que se esperava dos genótipos usados como testemunhas ou tratamentos comuns (Tabela 5.4). A cultivar FiberMax 966 se mostrou suscetível a *M. incognita*, apresentando o maior fator de reprodução (59,48). O TX 25 e M315 apresentaram os menores fatores de reprodução (0,23 e 0,37, respectivamente), e ambos reduziram 99% o fator de reprodução, em relação a FiberMax 966. Sabe-se que a resistência do genótipo M315 é efetiva no controle de *M. incognita* raça 3. Essa resistência é conferida por dois genes, um deles dominante derivado do acesso Auburn 623, gene MiC 11, no cromossomo 11 (McPherson et al., 2004) e o outro recessivo, que seria derivado da cultivar moderadamente resistente Clewewilt 6-1, MiC 07, no cromossomo 7 (Shen et al., 2006).

classificação aqui adotada de Starr e Mercer (2009), se apresentaram como resistentes. Pois permitiram uma reprodução de 8,34% e 14,12% para LA887 e DeltaOpal, respectivamente,

Genes para resistência a *M. incognita* no algodoeiro estão presentes no cromossoma 11 (Wang et al., 2006) e também no cromossomo 14 (Ynturi et al., 2006). O gene do cromossomo 14 desempenha papel na expressão da resistência poligênica (Ynturi et al., 2006). O mecanismo de resistência de DeltaOpal é tardio; pois, permite que o juvenil do nematoide penetre, inicie seu sítio de alimentação, injete as toxinas responsáveis pela hiperplasia e hipertrofia das células e ocasione as galhas, causando, assim, algum grau de doença. No caso de LA887 esse grau moderado de resistência é originário do acesso CleveWilt 6, que apresenta um gene de dominância recessiva (Robinson et al., 2004). Mesmo um dos genitores sendo o mesmo para M315 e LA 887, os dois genótipos têm comportamentos diferentes.

Tabela 5.4 Médias do índice de galhas (IG), índice de massa de ovos (IMO) e fator de reprodução (FR) de *M. incognita*, raça 3, em genótipos de *Gossypium hirsutum*. Experimento 2. Goiânia, 2013.

Tratamentos	IG	IMO	FR
FiberMax 966	4,83	4,83	59,49
TX 25	3,66	1,83	0,23
M 315	1,33	1,00	0,37
LA 877	4,66	4,00	4,94
Delta Opal	5,00	4,83	8,40
Média geral	4,51	3,27	6,05
Média testemunhas	3,9	3,3	14,69
Média genótipos	4,60	3,26	4,76
Média Federer	4,58	3,26	5,08

Observando os índices de galhas (IG), índice de massas de ovos (IMO) e fator de reprodução (FR) das plantas a segunda geração, pela análise de variância não houve diferença estatística entre os tratamentos, em nenhuma das variáveis estudadas (Tabela 5.5). Entretanto, pelo método de Starr & Mercer (2009) a variação no fator de reprodução foi grande. Sendo possível dividir os genótipos em resistente, moderadamente resistente e suscetíveis. A geração F₂ permitiu uma reprodução de apenas 8% dos nematoides, sendo assim classificadas como resistentes.

Genótipos	GL	IG	IMO	FR
-----------	----	----	-----	----

Bloco	5	-	-	-
F2 (Trat. Adj)	204	-	-	-
Resíduo	20	-	-	-
Média geral	-	4,51	3,27	6,05
Média das test.	-	3,90	3,30	14,69
Média dos gen.	-	4,60	3,26	4,76
Média Federer	-	4,58	3,26	5,08
F		0,86 ^{ns}	1,84 ^{ns}	0,15 ^{ns}

Tabela 5.5 Resumo da análise em relação a índice de galhas (IG), índice de massa de ovos (IMO) e fator de reprodução (FR) de *M. incognita*, raça 3, em genótipos de *Gossypium hirsutum*, para a geração F₂, segundo análise de Federer. Experimento 2. Goiânia, 2013.

^{ns}: Não significativo (Teste F a 5%).

Analisando a reação das plantas da geração F₂, no segundo experimento (Figura 5.2), percebe-se que os genótipos se mostraram na sua maioria como resistentes. Apresentando comportamento semelhante aos observados no primeiro ensaio. Associando o comportamento observado nos histogramas dos dois experimentos (Figura 5.1 e Figura 5.2) e o teste de aderência realizado para o primeiro experimento, verifica-se que as plantas apresentam herança de caráter oligogênico. Admitindo-se dois genes envolvidos no controle do caráter da resistência e, que estes localizam em cromossomos diferentes, logo pode esperar uma distribuição independente destes genes.

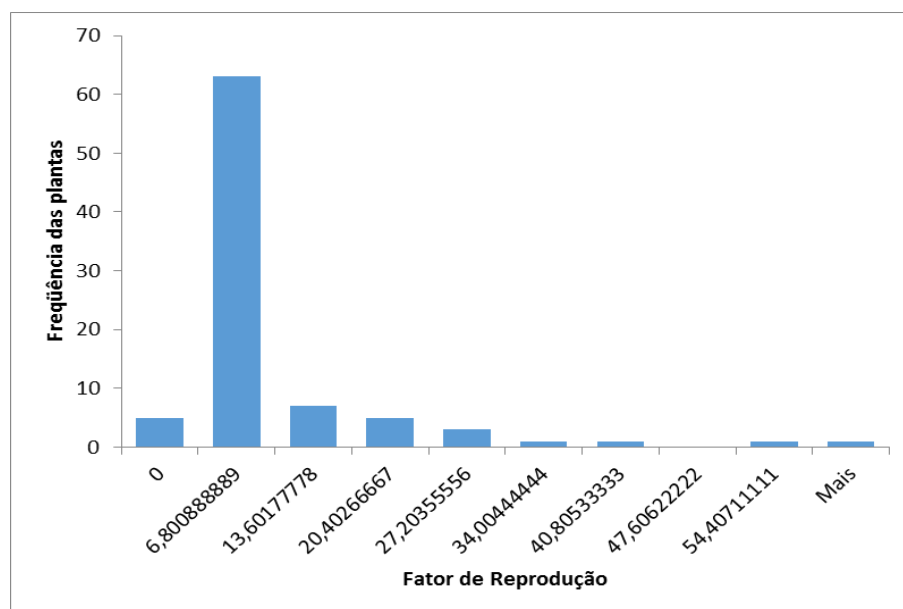


Figura 5.2 Comportamento de genótipos de algodoeiro, da geração F₂ em relação ao fator de reprodução para *Meloidogyne incognita*, no segundo experimento. Goiânia, 2013.

Para o manejo de doença de planta a resistência poligênica ou oligogênica se torna uma ferramenta interessante e necessária. Embora apresente diferentes graus de resistência, indo desde a extrema suscetibilidade até a extrema resistência, é mais estável, se comparada a resistência monogênica. Pois, para que o patógeno se torne virulento ao genótipo e suplante a resistência, assumindo as mesmas condições ambientais e genéticas, são necessárias mudanças genéticas em vários *loci* de patogenicidade (Tumura, 2011). Considerando o exposto, os genótipos de algodão estudados na presente pesquisa, apresenta resistência provavelmente oligogênica, que tende a diminuir a severidade da doença na área e recomenda-se inseri-las nos programas de melhoramento.

5.4 CONCLUSÕES

O genótipo TX 25 apresenta resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3.

O controle genético da resistência a *M. incognita*, raça 3, do genótipo TX 25 é predominantemente oligogênico;

6 CONCLUSÕES GERAIS

O genótipo TX 25:

- Apresenta resistência genética e bioquímica a *Meloidogyne incognita* raça 3;
- Diminui a penetração dos juvenis de segundo estágio nas raízes, retarda o desenvolvimento de *M. incognita* e afeta a biologia do nematoide, atrasa a formação de fêmeas adultas;
- Quando incitado por *M. incognita* produz reação de hipersensibilidade;
- Possui herança do caráter oligogênico;
- Confere resistência a *M. incognita* através dos derivados de gossypol, flavonóides glicolisados, sacarose, α glicose, β glicose e hemigossipol metoxilado.

7 REFERÊNCIAS

- ADEGBITE, A. A.; ADESIYAN, S. O. Root extracts of Plants to control Root-knot nematode on edible soyabean. **World Journal of Agricultural Sciences**, Ibadan, v. 1, p. 18–21, 2005.
- ASMUS, G. L.; FERRAZ, L. C. C. B. Relação entre densidade populacional de *Meloidogyne javanica* e a área foliar, a fotossíntese e os danos causados a variedades de soja. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 25, n. 1, p. 01-13, 2001.
- ASMUS, G. L.; INOMOTO, M. M. Manejo de Nematóides. In: FREIRE, E. C. (Ed.). **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília: Abrapa. 2007, cap. 15, p. 551-580.
- ASMUS, G. L. Ocorrência de nematóides fitoparasitos em algodoeiro no estado de Mato Grosso do Sul. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p.77-86. 2004.
- BEIL, A. A. Formation of gossypol in infected or chemically irritated tissues of *Gossypium* species. **Phytopathology**, St. Paul, v. 57, p. 759-763. 1967.
- BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P.; CARDOSO, G. D.; VALE, L. S.; ALBUQUERQUE, W.G. Ecofisiologia do Algodoeiro. In: BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P. (Ed.). **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2008. v.1, cap. 3, p. 60-128.
- BOIÇA-JUNIOR, A. L.; CHAGAS FILHO, N. R.; JESUS F. G.; CAMPOS, A. P. Metodologia de pesquisa em resistência de plantas a insetos. In: ARAUJO, E. S.; VACARI, A. M.; CARVALHO, J. S.; GOULART, R. M.; CAMPOS, A. P.; VOLPE, H. X. L. **Tópicos em Entomologia Agrícola**. Jaboticabal. 2008, p. 145-161
- BYBD, D. W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 15, p. 142-143, 1983.
- 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**, Brasília, v. 25, p. 35-44, 2001.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; NEVES, D. I.; FALCÃO, R.; PAES, N. S.; CIA, E.; SÁ, M. F. G. Resistência de genótipos de algodoeiro a *Meloidogyne incognita* raça 3: Reprodução e histopatologia. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, n. 1, p. 1-10. 2005.
- CARVALHO, L. P. O gênero *Gossypium* e suas espécies cultivadas e silvestres. In: BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D.M.P. (Ed.). **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2008. v. 1, cap. 8, p. 251-270.
- CLIFF, G. M.; HIRSCHMANN, H. H. Evaluation of morphological variability *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, Leiden, v.17, p. 445-449, 1985.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. **Série históricas, algodão**. Brasília: Conab, 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t>>. Acesso em 10 out. 2013.

CONAB. **Série histórica: soja**. Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&ordem=produto&Pagina_objcmsconteudos=3#A_objcmsconteudos>. Acesso em 10 out. 2013.

COSTA S. R.; BUENO. M. G. **A saga do algodão**: das primeiras lavouras à ação na OMC. Rio de Janeiro: Insight Engenharia, 2004. 144p.

CRUZ, C. D. **Programa Genes - Estatística Experimental e Matrizes**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. v. 1. 285 p.

DAS, S.; DEMASON, D. A.; EHIERS, J. D. Histological characterization of root-knot nematode resistance in cowpea and its relation to reactive oxygen species modulation. **Journal of Experimental Botany**, Vancouver, v. 59, p. 1305–1013. 2008.

DIAS, G. B.; RANGEL, T. B. A. Indução de resistência em plantas: O papel do oxido nítrico. **Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia**, Vitória, n. 3, p.1-8. 2007.

EISENBACK, J. D. Loss of resistance in tobacco cultivar ‘NC 95’ by infection of *Meloidogyne arenaria* or *M. hapla*. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 14, p. 339 – 343, 1983.

ENGEL, S.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Chemical ecology of marine microbial defense. **Journal of Chemical Ecology**, Vancouver, v. 28, n. 10, p. 1971-1985, 2002.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. An over view of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, London, v. 31, n. 2, p. 57-139, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/20014091076695>>. Acesso em: 10 out. 2013.

FEDERER, W. T. Augmented (hoonuiaku) designs. **Hawaiian Planters’ Record**, Aiea, v. 55, p.191-208, 1956.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R.; Nematóides. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2011. v. 1, cap.13, p. 277-305.

FLOR, H. H. Inheritance of pathogenicity in Melampsoralini. **Phytopathology**. St. Paul. v. 32, p.653-669. 1942.

FUZATTO, M. G.; CIA, E. Algodoeiro: Novas cultivares IAC destacam-se pela resistência a doenças. **O Agrônomo**, Campinas, v. 53, p. 19-20, 2001.

GALO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. I.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. Toxocologia de inseticidas. In:

GALO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. I.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J. R. S, OMOTO, C. **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo: Fealq, 2002, cap.11, p. 361-395.

GOELDI, M. A. Relatório sobre a moléstia do cafeeiro na província do Rio de Janeiro. In: **Arquivos do museu nacional**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1892. v. 3, p. 7-12.

GREECH, R. G.; JENKINS, J. N.; TANG, B.; LAWRENCE, G. W.; MCCARTY JUNIOR, J. C. Cotton resistance to root-knot nematode: I Penetration and Reproduction. **Crop Science**, Beltsville, v. 35, p. 365-368, 1995.

GRIFFITHS, A.; WESSLER, S.; LEWONTIN, R.; CAROLL, S. Herança monogênica. **Introdução a genética**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan. 2011, cap. 2, p. 25 -74.

GRIN. **National germoplasm resources laboratory**. Disponível em: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/display.pl?1897306>. Acesso em 31 jan. 2014.

GUEDES, R. N. C.; PICANÇO, M. C.; PEREIRA, E. J. G.; SILVA, E. M.; SILVA, G. A.; SOARES, F. F. Características dos principais grupos de inseticidas e acaricidas. In: ZAMBOLIM, L.; PICANÇO, M. C.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R.; FERREIRA, F. A.; JESUS JUNIOR, W. C. (Eds.) **Produtos fitossanitários: fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas**. Viçosa; UFV. 2008, cap. 11, p. 489-518.

GUTIÉRREZ, O. A.; JENKINS, J. J.; MCCARTY, J. C.; WUBBEN, M. J.; HAYES, R. W.; CALLAHAN, F. E. SSR markers closely associated with genes for resistance to root-knot nematode on chromosomes 11 and 14 of Upland cotton. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.121, p. 1323-1337, 2010.

HARTMAN, K. M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (Ed.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. v. 2, Methodology Raleigh: North Carolina State University Graphics, p. 69-77. 1985.

HEDIN, P. A.; SHEPHERD, R. L.; KAPPELMAN, A .C. Evaluation of cotton polyphenols as factors of resistance to root-knot nematode and fusarium Wilt. **Journal agricultural food chemistry**, Washington, v. 32, p. 633-638, 1984.

HUANG, C. S. Formation, anatomy, and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes. In: SASSER J. N.; CARTER C. C. (Eds.) **An advanced treatise on Meloidogyne. Biology and control**. Raleigh: Press. 1985. v. I. p. 155 -164.

HUANG, C.; ROHDE, R. A. Phenol accumulation related to resistance in tomato to infection by roots knot and lesion nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.5. p. 253-257.1973.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 57, p. 1.025-1.028, 1973.

HUTCHINSON, J. B. **Intra-specific differentiation in *Gossypium hirsutum***. Los Angeles, v. 5 p. 163-193. 1951.

IAMAMOTO, M. M. **Doenças foliares do algodoeiro**. Jaboticabal: Funep, 2003. 30p.

JENKINS, J. N.; CREECH, R. G.; TANG, B.; LAWRENCE, G.W.; MCCARTY, J. Cotton resistance to root-knot nematode: II. Post-penetration development. **Crop Science**, Madison v.35, p.369-373, 1995.

JOHNSON, A. W.; DOWLER, C. C.; HANDOO, Z. A. Population Dynamics of *Meloidogyne incognita*, *M.arenaria*, and Other Nematodes and Crop Yields in Rotations of Cotton, Peanut, and Wheat Under Minimum Tillage. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 32, n. 1, p. 52–61, 2000. (The Society of Nematologists.)

KHOSHKHOO, N.; HEDIN, P. A.; MCCARTEY JUNIOR, J. C. Terpenoid aldehydes in root-knot nematode susceptible and resistance cotton plants. **Journal agricultural food chemistry**, Washington, v. 42, p. 204-208, 1994.

KUBO, R. K.; MACHADO, A. C. Z.; OLIVEIRA, C. M. G. Efeito do tratamento de sementes no controle de *Rotylenchulus reniformis* em dois cultivares de algodão. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.2, p. 239-245, abr./jun. 2012.

LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas cultivadas**. Piracicaba: Nobel, 1992. 314 p.

MACE, M. E.; HOWELL C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedling. **Canadian Journal of Botanic**, Canada, v. 52, p. 2423-2426.1974

MACHADO, A. Q.; CASSETARI NETO, D. *Fusarium* no MT. **Cultivar**, Pelotas, v. 1, n. 58, p. 06 – 07. 2004.

MAXWELL, F. G.; JENKINS, J. N. PARROTT, W. L. Resistance of plants to insects. **Advance in Agronomy**.Canada,v. 24,p. 187-265.1972.

MCCLURE, M. A. Comparative biochemistry of cotton resistant and susceptible to the root-knot nematode. **Phytochemistry**, Tucson, v. 11, n. 7, p. 2209-2212, jul. 1972.

MENTEN, J. O.; MORAES, M. H. D. Tratamento de sementes: Históricos, tipos, características e benefícios. **Informativo abrates**, Piracicaba,v.20, n.3, p.52-53. 2010

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid glycines.**Journal of Chromatography A**, Oxford, v. 897, p. 177–184, 2000.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Brasília, 2003. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acessoem: 10 mai.2013.

MOLAN, A. L.; ALEXANDER, R.; BROOKAS, I. M.; MCNABB, W. C. Effect of sulla condensed tannis on the viability of tree sheep gastrointestinal nematodes. **New Zealand Society of Animal Production**, New Zealand, v. 60, p.21-25, 2000.

MOTA F. C. **Análise de fontes de resistência do algodoeiro a *Meloidogyne incognita* raça 3 e caracterização histopatológica da interação planta-nematoide.** 2011. 83 f. Dissertações (Mestrado em Fitopatologia) Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

NARAYANA, Y. D.; REDIX, D. D. R. The role of nitrogen amino acids and phenols in resistance of tomato to root-knot nematodes. **Nematologia Mediterrânea**, Bangalore, v. 8, p. 51-57, 1980.

OGALO, J. L.; GOODELL, P. B.; ECKERT, J; ROBERTS, P. A. Evaluation of nem X a new uplant cotton cultivar with hight resistance to *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, Sacramento, v.29, p.531-537, 1997.

OLIVEIRA, M. A. C. **Controle genético da resistência ao agente causal da ramulose no algodoeiro herbáceo.** 2009. 119 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededelingen Van De Landbouwhogeschool**, Nederland, v. 66, n. 4, p.1-46, 1966.

PAGE, S. L.; BRIDGE, J. The African cotton root nematodes, *Meloidogyne acromia*, its pathogenicity and intra-generic infectivity. **Fundamental Applie Nematology**, Sacramento, v. 17, p. 67-73, 1994

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE; J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos.** 4 ed. São Paulo: Ceres, 2011, v.1, cap.35, p. 593-637.

PEGARD, A.; BRIZZARD, G.; FAZARI, A.; SOUCAZE, O.; ABAD, P.; DJIAN-CAPORALINO, C. Histological Characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annum*. **Phytopathology**, Nice, v. 95, p. 158-165, 2005.

PETRY, R. D.; SOUZA K. C. B.; BASSANI, V. L.; PETROVICK, P. R.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G. Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcóolicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmácia**, São Paulo, v. 79, n. 1/2, p. 7-10, 1998.

POWELL, N. T. Histological basis of resistance to root-knotnematodes in flue-cured to bacco. **Phytopathology**, Berkley, v. 52, p. 277-283. 1962.

RAMALHO, M.; SANTOS, J. B; PINTO, C. B. Mendelismo. **Genética na agropecuária.** 6. ed. São Paulo: Globo, 1997, cap 4, p. 75-91.

RANDIG, O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R. M. D. G.; CASTAGNONE-SERENO, P. Genetics diversity of root-knot nematode from Brazil as inferred from RAPD analysis and development of SCAR markers specific for the coffee damaging species *Genome Research*, **Genome**, Antibes, v. 45, p.862-870, 2002.

REZENDE, J. A. M.; MASSOLA JUNIOR, N. S.; BEDENDO, I. P.; KRUGNER, T. L. Conceito de Doença, Sintomatologia e Diagnose. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2011. v. 1, cap. 3, p. 37-58.

ROBERTS, P. A. Concepts and Consequences of Resistance. In: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant Resistance to Parasitic Nematodes**. Wallingford: CAB International, 2002. p. 25-41.

ROBINSON, A. F.; PERCIVAL, A. E. Resistance to *Meloidogyne incognita* raça 3 and *Rotylenchulus reniformis* in wild accessions of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* from Mexico. **Journal of Nematology**, Sacramento, v.29, p. 746-755. 1997

ROBINSON, A. F.; BOWMAN, D. T.; COOK, C. G.; JENKINS, J. N.; JONES, J. E.; MAY, L. O.; OAKLEY, S. R.; OLIVER, M. J.; ROBERTS, P. A.; ROBINSON, M.; SMITH, C. W.; STARR, J. L.; STEWART, J. M. C. D. Nematode resistance. In: KIRKPATRICK, T. L.; ROTHROCK, C. S (Eds.). **Compendium of Cotton Diseases**. St. Paul: APS Press. p. 68–79. 2001.

ROBINSON, A. F.; BRIDGES, A. C.; PERCIVAL, E. 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**, St. Paul, v. 8, 191-197. 2004.

SANTOS, W. J. Manejo das pragas do algodão com destaque para o cerrado brasileiro. In: FREIRE, E. C (Ed.). **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília: Abrapa. 2007, cap. 12, p. 403 -478.

SASSER, J. N.; FRECKMANN, D. W. A world prospective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON D. W. (Eds.). **Nematology**. Hyattsville: Society of Nematologists, 1987. p. 7–14.

SHAKIL, N. A.; PANKA, J.; KUMAR, J.; PANDEY, R. K.; SAXENA, D. B. Nematicidal prenylated flavanones from *Phyllanthus niruri*. **Phytochemistry**, Oxford, v.69, n.3, p.759-764, 2008.

SHEN, X.; VAN BECELAERE, G.; KUMAR, P.; DAVIS, R. F.; MAY, O. L.; CHEE, P. QTL mapping for resistance to root-knot nematodes in the M-120 RNR Upland cotton line (*Gossypium hirsutum* L.) of the Auburn 623 RNR source. **Theoretical and Applied genetics**, Tifton, v. 113, n. 8, p. 1539-49, sep./nov. 2006.

SHEPHERD, R. L. New sources of resistance to root-knot nematodes among primitive in cottons. **Crop Science**, Madison, v. 23, n. 5, p. 999-1002, 1983.

SIJMONS, P. C.; ATKINSON, H. J.; WYSS, U. Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. *Annual Review of Phytopathology*, Beltsville, v. 32, p. 235-259, 1994.

SILVA, R. A.; REIS, V. M.; BLADANI J. I.; OLIVARES, F. L. **Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos**. Seropédica: Embrapa, 2008, 49 p.

SITARAMAIAH, K. & PATHAK, K. N. Effect of phenolics and an aromatic acid on *Meloidogyne javanica* infecting tomato. *Nematologica*, Bruxelas, v. 25, n. 3, p. 281-287, 1979.

SOARES, P. L. M.; SANTOS, J. M. dos. Nematóides-chave do algodoeiro no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 25. 2005, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2005. p. 109.

SOUZA, J. G.; BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P.; ALBUQUERQUE, W. G.; LIMA, R. L. S.; CARDOSO, G. D. Fisiologia. In: BELTRÃO, N. E. M. & AZEVEDO, D. M. P. **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2008. v. 1, cap. 7, p. 119-170.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. *Scientia Agraria Paranaensis*, Marechal Cândido Rondon, v. 10, n. 1, p 18-46. 2011.

STARR, J. L.; PAGE, L. J. Nematode parasites of cotton and other tropical fibre crops. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. CAB International, 1993, cap. 17, p. 539-556.

STARR, J. L.; MERCER C. F. Development of Resistant Varieties. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Eds.) **Root-Knot nematodes**. CAB International, 2010, cap. 14, p. 326 -337.

STARR, J. L.; SMITH, C.W. Root-Knot nematodes and *Fusarium* wilt resistance to both pathogens. In: HERBER, D. J.; RICHTER, D. A. (Eds.) **Proc. Beltwide Cotton Productions Research Com.** New Orleans: Natl Cotton Council Am, Memphis, 1993. p.178-180.

STEWART. J. M. Germplasm resources for physiological research and development, In: Stewart. J. M.; OOSTERHUIS, D. M.; HEITHOLT, J. J.; MAUNEI, J. R (Eds.). **Physiology in cotton**. New York: Springer. 2010, cap. 2. p.19-23.

STIPANOVIC, R. D.; ALTMAN, D. W.; BEGIN, D. L.; GREENBLATT, G. A.; BENEDIC, J. H. Terpenoid aldehydes in Upland cottons: analyses by aniline and HPLC. *Journal Agricultural Food Chemistry*, Washington, v. 36, p. 509-515, 1988.

STIPANOVIC, R. D.; BELLA. A.; LUKEFAHR, M. J. Natural insecticides from cotton (*Gossypium*). **Host Plant Resistance to Pests**. Washington: n. 62. p. 197-214. 1977

SUASSUNA, N. D.; CHITARRA, L. G.; ASMUS G. L.; INOMOTO, M. M. Manejo de doenças do algodoeiro. **Circular Técnica**, **97**, Campina Grande: Embrapa Algodão. 2006. p. 7-17.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. Biology, identification and control of root-knot nematodes. **Internacional Meloidogyne Project**. North Carolina: State University, 1978. 111p.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 372 p.

TUMURA, K. G. **Avaliação de resistência, análise epidemiológica e caracterização anatômica da madeira em clones de *Eucalyptus* sp. infectados por *Ceratocystis fimbriata***. 2011. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2011.

VEECH, J. A. An apparent relationship between methoxy-substituted terpenoid aldehydes and the resistance of cotton to *Meloidogyne incognita*. **Journal Nematology**, Texas, v. 24, p. 81-87, 1978.

VEECH, J. A. Phytoalexins and their role in the resistance of plants to nematodes. **Journal Nematology**, Texas, v. 14, p. 2 - 9, 1982.

VIDHYASEKARAN, P. **Physiology of disease resistance in plant**. Boca Rotan: CRC Press, 1988. 149 p.

WALLA, R. K.; NANDAL, S. N.; BHATTI, D. S. Nematicidal efficacy of plant leaves and *Paecilomyces lilacinus*, alone or in combination, in controlling *Meloidogyne incognita* on okra and tomato. **Nematological Mediterrean**, Madisonv, 27, p. 3-8, 1999.

WANG, C.; ULLOA, M.; ROBERTS, P. A. Identification and mapping of microsatellite markers linked to a root-knot nematode resistance gene (rkn 1) in AcalaNemX, cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Der Züchter, v. 112. p.770-777. 2006.

WELLS, R.; STEWART, A. M. Morphological alterations in response to management and environment. In: STEWART, A. M.; OOSTERCHUI D. M.; HEITHOLT, J. J.; MAUNEYJACK, R. **Physiology of cotton**. New York: Springer Dordrecht, 2010, cap 3, p. 24-32.

WENDEL. J. F.; BRUBAKER, C. L.; SEELANAN, T. The origin and evolution of *Gossypium*. In: Stewart. J. M.; OOSTERHUIS, D. M.; HEITHOLT, J. J.; MAUNEI, J. R (Eds.). **Physiology in cotton**. New York: Springer. 2009, cap. 1. p.1-18.

YNTURI, P.; JENKINS, J. N.; McCARTY, J. C.; GUITERREZ, O. A.; SASHA, S. Association of root knot nematode resistance gene with simple sequence repeat markers on two chromosomes in cotton. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 2670-2674, 2006.

ZAKI, F. A.; BHARN, D.S. Economical method for mass culturing of *Paecilomyces lilacinus*. **Current Science**, New York, v.57. p.153.1988.

ZHANG, X. D.; CALLAHAN, F. E.; JENKINS, J. N.; MA, D. P.; KARAÇA, M.; SAHA, S.; CREECH, R. G. A novel root specific gene MIC-3, with increased expression in nematode-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L) after root-knot nematode infection. **Biochimica et Biophysica Acta**, Jackson, v.1576, n.1/2, p. 214-218, 2008.

ZHOU, E.; STARR, J. L. A comparison of the damage functions, root galling, and reproduction of *Meloidogyne incognita* on resistant and susceptible cotton cultivars. **Journal of Cotton Science**, Bossier City, v. 7, n. 4, p. 224-230, 2003.