

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

REGENERAÇÃO DE CLONES DE ALHO (Allium sativum L) INFETADOS  
POR UM POTYVIRUS

JULIO DANIELS

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Vegetal  
da Universidade de Brasília como requisito parcial à  
obtenção do Grau de Mestre em Fitopatologia.

BRASÍLIA  
1977

Trabalho realizado junto aos Departamentos de Biologia Vegetal e de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação dos Professores Francisco Pereira Cupertino e Ming-Tien Lin ( Laboratório de Fitopatologia ), Linda Styer Caldas ( Fisiologia Vegetal ) e Elliot Watanabe Kitajima ( Microscopia Eletrônica ) com o apoio institucional da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

2

ALIZIA

JULIANO

E LUCIANO

AGRADECIMENTOS

- Aos professores:

Francisco Pereira Cupertino

Ming-Tien Lin

Linda Styer Caldas

Elliot Watanabe Kitajima

Cláudio Lúcio Costa

- Aos funcionários

Maria do Céu Alves Abreu - Lab. Micr. Eletrônica

Nestor Bezerra de Lima - Lab. Fotodocumentação

Fábio Rocha Fonseca - Estação Biológica

João Gonçalves de Carvalho - Estação Biológica

Anastácio Lourenço Ferreira - Lab. Fisiol. Vegetal

José de Almeida Sousa - Lab. Fitopatologia

Maria Crispim de Sousa - Secretaria do VEG

- A todas as pessoas e instituições que tornaram possível a realização do presente trabalho.

ABREVIATURAS USADAS NO TEXTO

- A280/A260 - absorbância a 280 nanômetros sobre absorbância a nanômetros.
- EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético
- NAA - ácido  $\alpha$ -naftaleno acético
- SDS - dodecil sulfato de sódio
- M.E. - microscópio eletrônico
- g/l - grama por litro
- mg/l - miligrama por litro
- nm - nanômetro
- rpm - rotações por minuto
- OYDV - Onion Yellow Dwarf Virus
- PVS - Potato Virus S
- (l/l;V/V) - um para um; volume por volume
- (l/l; p/v) - um para um; peso por volume
- AS - antissoro
- SN - soro normal
- M.E. - microscópio eletrônico
- VEG - Departamento de Biologia Vegetal
- $\mu$ m - micrômetro
- U.V. - ultra violet

## ÍNDICE DOS QUADROS

Quadro 1:	Meios utilizados para cultura de meristemas apicais de alho.....	9
Quadro 2:	Temperaturas registradas durante o período em que foram realizados experimentos de inoculação do vírus associado ao Mosaico de Alho .....	12
Quadro 3:	Plantas-teste utilizadas nos experimentos de inoculação com o vírus associado ao Mosaico de Alho .....	13
Quadro 4:	Tratamento térmico contínuo de bulbilhos de Alho em estado de dormência .....	19
Quadro 5:	Tratamento térmico intermitente de bulbilhos e alho (8 horas nas estufas e 16 horas em temperatura ambiente - 22 a 28°C) .....	20
Quadro 6:	Tratamento com água quente de bulbilhos de alho do clone Vila Verde com dormência quebrada pela permanência por mais de um mês em câmara fria(+ 12° C ) .....	21
Quadro 7:	Resultado, por clone, das percentagens de meristemas desenvolvidos, de plântulas obtidas e de plântulas possivelmente sem vírus .....	24
Quadro 8:	Efeito do estado fisiológico dos bulbilhos sobre a percentagem de plântulas obtidas e plântulas sem vírus .....	25

Quadro 9:	Efeito do tipo ou tamanho do meristema sobre seu desenvolvimento e sobre a percentagem de plântulas obtidas e sem vírus .....	26
Quadro 10:	Resultados obtidos na cultura de meristemas, pela utilização dos métodos de Wang & Huang (1974) e de Quiot <u>et al.</u> (1972) .....	27

ÍNDICE DAS FIGURAS

Fig. 1. Dissecção de meristemas apicais de bulbilhos de alho ..... 6

Fig. 2. Fases do desenvolvimento de meristemas apicais de bulbilhos de alho .....29

Fig. 3. Vírus associado ao Mosaico do Alho: 1) Diagrama de distribuição das mensurações das partículas; 2) Curvas de absorção de luz ultra-violeta pelos materiais das bandas obtidas nas tentativas de purificação de vírus em gradiente de sacarose.....32

Fig. 4. Micrografias eletrônicas de partículas e inclusão lamelar, associados ao Mosaico do Alho .....33

Fig. 5. Testes de dupla imunodifusão em agar-gel do antissoro obtido contra o vírus associado ao Mosaico do Alho...35

Fig. 6. Micrografias eletrônicas de secções ultra-finas dos tecidos de fôlhas de alho com sintomas de mosaico....37



## ÍNDICE GERAL

- Apresentação .....	i
- Dedicatória .....	ii
- Agradecimentos .....	iii
- Abreviaturas usadas no texto .....	iv
- Índice dos quadros .....	v
- Índice das figuras .....	vii
- Índice geral .....	viii
I. Introdução .....	1
II. Materiais e métodos .....	4
A. Tratamento térmico de bulbilhos de alho .....	4
B. Cultura de meristemas apicais de alho .....	5
C. Cultura de meristemas apicais de alho .....	10
C.1. Inoculações em plantas-teste .....	10
C.2. Purificação e serologia .....	14
C.3. Microscopia eletrônica .....	16
III. Resultados .....	18
A. Tratamento térmico de bulbilhos de alho .....	18
B. Cultura de meristemas apicais de alho .....	23
C. Diagnose do vírus em alho .....	30
C.1. Inoculações em plantas-teste .....	30
C.2. Purificação e serologia .....	31
C.3. Microscopia eletrônica .....	36
IV. Discussão .....	38
V. Resumo .....	42
VI. Summary .....	44
VII. Bibliografia .....	46

## I. INTRODUÇÃO

O alho (Allium sativum L.) é uma liliacea cujos bulbos são utilizados como condimento na maioria dos lares brasileiros. Com um consumo anual per capita superior a quinhentos gramas, o Brasil produz pouco mais da metade do alho aqui consumido. Em 1973, o país produziu 30.583 toneladas de alho (Fundação IBGE, 1975), e importou 27.452 toneladas do produto, num valor superior a vinte e um milhões de dólares (Brasil, Comércio Exterior, 1974).

A baixa produtividade da cultura, 2652 Kg/ha (Fundação IBGE, 1975), tem sido apontada como uma das causas da crônica in suficiência do país neste produto. Entre as causas determinantes dos baixos rendimentos da lavoura, estão as doenças que afetam a planta, e entre estas, destaca-se, o Mosaico do Alho.

O Mosaico do Alho é uma virose conhecida há mais de trinta anos no Brasil (Costa et al., 1966). O agente etiológico da doença passa através dos bulbilhos e, como o alho se reproduz vegetativamente através destes órgãos, a cada plantio se faz a perpetuação do vírus. Nos clones de alho cultivados no estado de São Paulo foi observada a incidência da doença em 100% das plantas (Costa et al., 1966), sendo muito provável que todo alho cul tivado no país esteja infetado pelo vírus.

Não foram determinados, ainda, os prejuízos causados pelo Mosaico do Alho no Brasil. Porém, na França foi estimada uma redução na produtividade do alho, causada pela doença, da ordem de 5 a 15% em clones tolerantes ao vírus e de 27 a 35% em clone mais susceptível (Quiot et al., 1972).

A principal evidência de que o vírus causador do Mosaico do Alho seria uma estirpe mais fraca de Onion Yellow Dwarf Virus, agente etiológico do Mosaico-em-Faixas da cebola, foi conseguida por Brierley & Smith (1946). Esses autores, usando como

fonte de inóculo plantas de alho e cebola com sintomas de mosaico e, como plantas-teste 26 variedades de cebola, conseguiram infectar 19 delas, sendo que os sintomas obtidos foram mais fortes quando o inóculo era proveniente de alho.

A morfologia dos dois vírus é muito semelhante (Costa et al., 1966), tendo êsses autores sugerido a possibilidade de ser o alho fonte de inóculo do Mosaico-em-Faixas para plantações de cebola pois o vírus que afeta esta espécie não passa através de sementes (Melhus et al., 1929).

Porém, os testes de transmissão têm suscitado dúvidas a respeito da identidade do vírus causador do Mosaico do Alho. Ahlawat (1974), não conseguiu a transmissão de um vírus de alho para cebola, embora usasse métodos mecânico e biológico de inoculações, e nos trabalhos de Cadilhac et al. (1976), a transmissão do vírus revelou-se inconsistente.

Costa et al. (1966) determinaram o comprimento normal das partículas do vírus do alho que ocorre no Brasil como sendo 764 nanômetros, o que o enquadra no grupo Potyvirus (Harrison et al., 1971). Porém, na França, foram encontrados dois tipos de partículas de vírus diferentes causando mosaico em alho, dos grupos Carla e Potyvirus, respectivamente (Cadilhac et al., 1976).

A obtenção de clones de alho, livres de vírus e adaptadas ao nosso meio, é o primeiro passo para a determinação dos prejuízos da doença e, se fôr o caso, implantação de um programa visando a multiplicação desse material para substituição do alho infectado.

Visando esse objetivo, foi realizado o presente trabalho e, para alcançá-lo, empregou-se a termoterapia - o mais importante método para inativar vírus de plantas "in vivo" (Nyland & Goheen, 1969) - e a cultura de meristemas apicais - já usada com sucesso em alho (Havránek, 1972; Quiot, et al., 1972; Wang & Huang, 1974).

foram, também, estudados métodos de diagnose do vírus, visando determinar os melhores, a serem usados na indexação das plantas obtidas após os tratamentos.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### A. Tratamento térmico de bulbilhos de alho

Foram tratados bulbilhos de alho dos clones Roxo e Vila Verde. Usaram-se bulbilhos dormentes, como também, com dormência quebrada pela permanência por mais de um mês em câmara fria a 12°C. Os tratamentos foram subdivididos em três grupos: 1) calor sêco, no qual os bulbilhos, em número de dez por parcela, foram colocados em placas de Petri forradas com papel toalha e estas mantidas em estufas elétricas nas temperaturas prescritas para os tratamentos; 2) calor úmido, no qual as placas com os bulbilhos foram colocadas em dessecadores de vidro, nos quais fora substituída a sílica gel por água, para funcionarem como câmara úmida, os quais foram colocados nas estufas; 3) água quente, no qual os bulbilhos foram mergulhados em água mantida em temperatura constante de um banho-maria. Os tratamentos 1 e 2 foram divididos ainda em calor constante, no qual o material era deixado permanentemente nas temperaturas determinadas, e calor intermitente, no qual o material passava 8 horas do dia nas estufas e as restantes em temperatura ambiente (22 a 23°C). Antes da terapia, os bulbilhos foram submetidos a tratamento com fungicidas (1,2 g de Difolatan 50, mais 1,2 g de Botran por quilo de alho). Os bulbilhos umedecidos eram agitados em um balão de vidro contendo os fungicidas. Após o tratamento térmico de bulbilhos foram plantados em vasos de barro de 15 x 15 cm, em telado, e quinzenalmente eram observadas e anotadas as plantas que emergiam, bem como se exibiam os sintomas da virose.

As temperaturas e durações dos tratamentos constam dos quadros com os resultados apresentados adiante.

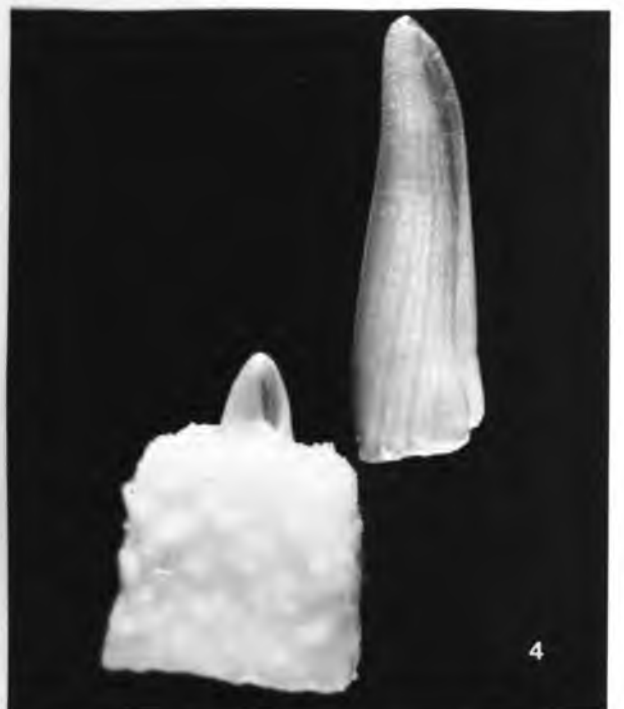
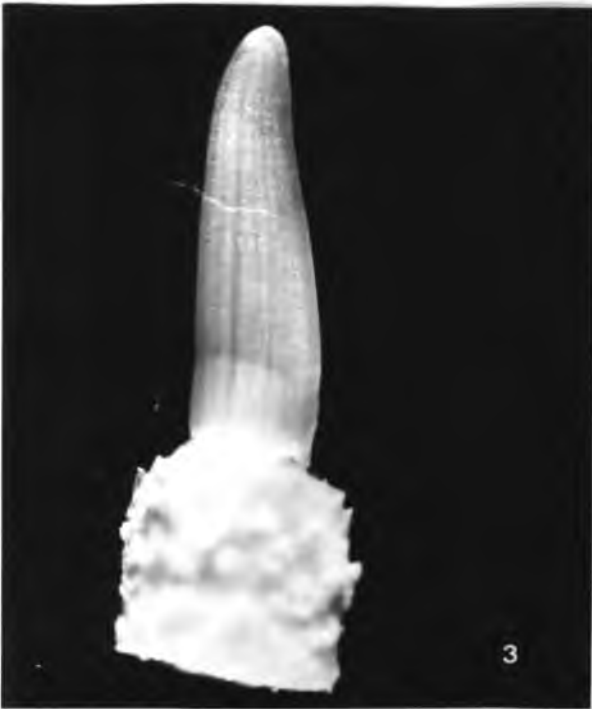
## B. Cultura de meristemas apicais de alho

Foram utilizados bulbilhos de cinco clones de alho: Amarante, Branco Mineiro, Lavínia, Roxo e Vila Verde. Os meristemas apicais foram obtidos pela dissecação, em câmara asséptica e sob lupa binocular, de bulbilhos de alho, previamente liberados das fôlhas protetoras e de brotos e raízes em desenvolvimento, e desinfetados com solução de hipoclorito de sódio a 1%, deixando-os após em placa com água esterilizada. Pouco antes da dissecação os bulbilhos eram deixados em solução de hipoclorito de cálcio a 2%, por 5 a 10 minutos e após lavados em água esterilizada. A assepsia das câmaras de transferência e dissecação era feita passando-se um pano umedecido em álcool e ligando-se, por vinte minutos, uma lâmpada de luz ultra-violeta. Foram usados bulbilhos em estado de dormência, bulbilhos brotados em câmara fria ( $\pm 12^{\circ}\text{C}$ ) e bulbilhos brotados em câmara de crescimento ( $25$  e  $33^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 14 horas, numa intensidade luminosa de 7.000 lux). Neste último caso, os bulbilhos com dormência quebrada pela permanência por mais de um mês em câmara fria, foram plantados em recipiente com vermiculite e deixados 14 a 19 dias na câmara de crescimento, até que as fôlhas atingissem um comprimento de cerca de 10 centímetros. Os meristemas extraídos foram de três tipos ou tamanhos: sem primórdio foliar (tamanho de 100 a 200 micrômetros); com um primórdio foliar (300 a 400 micrômetros) (Fig. 1.5); e com dois primórdios foliares (500 a 600 micrômetros) (Fig. 1.5).

Basicamente foi seguida a metodologia utilizada por Quiot et al. (1972) e por Wang & Huang (1974).

Pelo método de Wang & Huang (1974), utilizou-se o meio de cultura 1, do Quadro 1, sendo que no primeiro mês usou-se o meio com um terço da concentração e sem hormônio (NAA). Os frascos com os meristemas foram colocados nos seguintes ambientes:

Fig. 1: Dissecação de meristemas apicais de bulbilhos de alho:1) bulbilho de alho brotado; 2) Região do prato (caule) e base das fôlhas de bulbilhos parcialmente dissecado; 3) Região do prato e primórdio foliar bem desenvolvido; 4) Região do prato e primórdios foliares, estando um já des~~ta~~cado; 5) Região do prato e meristema com 2 primórdios foliares; 6) Região do prato e meristema com 1 primórdio foliar.





primeiro mês, temperatura ambiente (22 a 28°C) e intensidade luminosa constante de 40 lux; após, mesmas condições de temperatura, com intensidade luminosa constante de 500 lux, até que as plântulas estivessem bem enraizadas e com a parte aérea bem desenvolvida (+ 2 meses); então, as plântulas foram transferidas para areia contida em copos de plástico de 6 x 9 cm, molhadas manualmente com meio nutritivo líquido (sem agar e glucose) e diariamente com água, e deixadas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 7.000 lux e temperatura de 25°C, até que os bulbinhos se formassem e amadurecessem.

Pelo método de Quiot et al. (1972), utilizou-se o meio de cultura 2, do Quadro 1, que possui macro e micro - nutrientes nas concentrações correspondentes às do meio de Murashige & Skoog (1962), respectivamente cem e mil vezes maiores do que as citadas por Quiot et al. (1972). O hormônio (NAA) também foi usado numa concentração mil vezes maior do que a usada por estes autores. Os frascos com os meristemas foram colocados nos seguintes ambientes: primeiros 2 a 3 meses, a uma temperatura de 12°C, sob intensidade luminosa de 5.000 lux e fotoperíodo de 12 horas, até que as plântulas atingissem um tamanho de 5 cm; após, a uma temperatura de 18°C, sob intensidade luminosa de 5.000 lux e fotoperíodo de 14 horas, até que começasse o desenvolvimento de um pequeno bulbo; então, à 25°C, na mesma intensidade luminosa e fotoperíodo de 16 horas, até o secamento das folhas e amadurecimento dos bulbinhos.

Os bulbinhos obtidos por ambos os métodos foram deixados por um mês em geladeira ou câmara fria, 5 e 12°C respectivamente, para quebrar a dormência, plantando-os após em mistura de solo e vermiculite (1/1; v/v), contida em copos de plástico de 6 x 9 cm.

Foram usados frascos dos mais diversos tipos, desde tu  
bos de ensaio pequenos, de 0,8 x 7 cm, passando por vidros de re  
médio, tubos de ensaio maiores, até vidros tipo "french square" ,  
com capacidade para 50 ml. Os frascos sem tampa própria foram fe  
chados com papel de alumínio e vedados com fita gomada.

Q U A D R O 1

Meios utilizados para cultura de meristemas apicais de alho:

Meios de Cultura	1	2
a. Macronutrientes	mg/l	mg/l
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	510	-
KCl	240	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	720	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	120	170
NH <sub>4</sub> ·NO <sub>3</sub>	180	1.650
KNO <sub>3</sub>	-	1.900
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	440
b. FeEDTA	mg/l	mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8
c. Micronutrientes	mg/l	mg/l
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	22,3
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2
ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	8,6	8,6
KI	0,83	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
d. Vitaminas, proteínas, hormônio, purina e pirimidina:	mg/l	mg/l
Adenina	5	-
Biotina	0,01	-
Pantotenato de cálcio	10	-
Cistina	10	-
Caseína hidrolizada	1	-
Mio-inositol	0,1	-
Ácido nicotínico	1	-
Piridoxina	1	-
Timina	1	-
Ácido α-naftaleno acético (NAA)	0,5	0,1
e. Carboidrato e agar	g/l	g/l
Glucose	30	-
Sacarose	-	30
Agar	6	6

## C. Diagnose do vírus em alho

### C.1. Inoculação em plantas-teste

O trabalho, com duração aproximada de um ano, foi feito sob telado, sem controle de temperatura, que variou no período conforme os dados do Quadro 2.

As inoculações foram feitas mecanicamente, por diversos métodos, e biologicamente, com o afídio Myzus persicae Sulz.

Nas inoculações mecânicas usaram-se, como fonte do inóculo, sucos de folhas de alho dos clones Roxo e Vila Verde e suspensões com o vírus semi-purificado. Os sucos foram extraídos em tampões variáveis quanto ao tipo (fosfato e borato), molaridade (0,01 a 0,1 M), pH (6 a 8) e quanto a presença ou não de anti-oxidantes ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 2-mercaptoctanol, sulfato de nicotina e cafeína). Preparações com o vírus semi-purificado foram obtidas conforme método descrito adiante, item C.2. O inóculo foi aplicado nas plantas-teste por esfregaços nas folhas, usando-se os dedos; por injeções, conforme técnica de Dhingra & Mariani (1963), usada para transmitir o CYDV para cebola; e pelo método "tissue rub", idealizado por Yarwood (1953) e citado por Kado (1972), e que consiste em tomar um maço de folhas com o inóculo, cortar com tesoura ou faca e esfregar a face cortada nas folhas das plantas teste previamente polvilhadas com abrasivo. Na inoculação de plantas de cebola, realizou-se forte abrasão nas folhas, conforme recomendação feita por Louie & Lorbeer (1966), para transmissão do CYDV. Como abrasivos foram usados celite e carborundum.

Nas inoculações com o afídio M. persicae, foram usados dois métodos. No primeiro, comumente usado para vírus estiletares, os afídios com jejum de 3 a 5 horas foram deixados 30 minutos a 2 horas na fonte de inóculo (alho Roxo e Vila Verde) e 24 horas nas plantas-teste (variedades de cebola e alho Porró).

Foram colocados 5 afídios por planta. No segundo, usou-se o método para hospedeiros "transitórios" de afídios empregado por Marrou & Leroux (1972). Consistiu em deixar por cerca de 70 dias, em gaiolas com tela fina de 50 x 80 x 80 cm, plantas-teste ( 5 variedades de cebola ), plantas infetadas pelo vírus (alho Vila Verde) e planta de couve Gongarsol (Brassica oleracea var. acephala) infestada pelo afídio. As plantas-teste utilizadas haviam se desenvolvido sob telado e possuíam, no máximo, 40 dias de idade. A couve Gongarsol, também desenvolvida sob telado, foi infestada com afídios sadios, 15 dias antes do início do experimento.

Em todos os experimentos deixou-se séries de plantas-teste sem inocular, como controle.

As plantas-teste receberam adubação de cobertura, pois o suprimento com nitrogênio favorece a transmissão do OYDV para plantas de cebola (Brierley & Stuart, 1946).

Foram usadas 26 plantas-teste pertencentes a 6 famílias botânicas (Quadro 3), porém nem todas as espécies listadas foram usadas em todos os experimentos, dando-se prioridade às espécies das famílias Chenopodiaceae e Liliaceae, tidas como hospedeiras do vírus (Brierley & Smith, 1946; Cadilhac et al., 1976; Costa, 1977).

Q U A D R O 2

Temperaturas registradas durante o período em que foram realizados experimentos de inoculação do vírus associado ao Mosaico do Alho.

Mês	Máxima	Mínima	Média
Novembro / 76	30,3	18,1	23,2
Dezembro / 76	31,7	17,9	24,3
Janeiro / 77	26,9	17,6	24,0
Fevereiro / 77	28,1	16,9	25,1
Março / 77	31,0	16,3	27,0
Abril / 77	28,1	16,7	25,2
Maio / 77	27,0	12,3	23,1
Junho / 77	26,7	12,2	22,8
Julho / 77	28,4	9,3	23,7
Agosto / 77	31,0	11,7	26,2
Setembro / 77	29,5	15,0	25,4
Outubro / 77	29,6	16,6	25,9

Dados fornecidos pela Estação Meteorológica do Departamento de Engenharia Civil da Universidade de Brasília.

Q U A D R O 3

Plantas-teste utilizadas nos experimentos de inoculação com o vírus associado ao Mosaico do Alho.

Nome científico e cultivar	Nome comum
- Amaranthaceae:	
1. <u>Gomphrena globosa</u> L.	Perpétua
- Chenopodiaceae:	
2. <u>Chenopodium amaranticolor</u> Coste & Reyn.	-
3. <u>Chenopodium murale</u> L.	-
4. <u>Chenopodium quinoa</u> Willd.	Quinoa
- Euphorbiaceae:	
5. <u>Euphorbia prunifolia</u> Jacq.	Amendoim bravo
- Liliaceae	
6. <u>Allium cepa</u> L. " Baia Periforme "	Cebola
7. <u>Allium cepa</u> L. " Bojudá "	"
8. <u>Allium cepa</u> L. " Branca Rainha "	"
9. <u>Allium cepa</u> L. " Chata Amarela "	"
10. <u>Allium cepa</u> L. " Chata Roxa "	"
11. <u>Allium cepa</u> L. " Monte Alegre "	"
12. <u>Allium cepa</u> L. " Pera do Rio Grande "	"
13. <u>Allium cepa</u> L. " Roxa das Canárias "	"
14. <u>Allium cepa</u> L. " Texas Grano "	"
15. <u>Allium cepa</u> L. " White Creole "	"
16. <u>Allium fistulosum</u> L. "Todo Ano"	Cebolinha
17. <u>Allium porrum</u> L.	Alho Porró
- Solanaceae:	
18. <u>Capsicum annuum</u> L. " AG-10 "	Pimentão
19. <u>Datura stramonium</u> L.	Trombeteira
20. <u>Lycopersicon esculentum</u> Mill. " Angela "	Tomate
21. <u>Nicotiana debney</u> Domin.	Fumo
22. <u>Nicotiana silvestris</u> Spegaz. & Gomes	"
23. <u>Nicotiana tabacum</u> L. " TNN "	"
24. <u>Nicotiana tabacum</u> L. " Turkish "	"
25. <u>Physalis</u> sp.	Joá -de-capote
- Umbelliferae	
26. <u>Apium graveolens</u> L.	Aipo

## C.2. Purificação e serologia

Fôlhas de alho dos clones Roxo ou Vila Verde foram trituradas em 2,5 volumes de 0,2% de 2-mercaptoetanol e 0,5 M de uréia. Após filtração em duas camadas de gaze, o suco foi clarificado com n-butanol na proporção de 8 ml por 100 ml de suco, agitando-se por 30 minutos e centrifugando-se a 7.000 rpm, por 15 minutos, em rotor GSA Sorvall. O vírus foi concentrado e parcialmente purificado por 2 ciclos de centrifugações diferenciais: no primeiro usou-se rotor 30 Beckman, a 29.000 rpm, por 2 horas e no segundo, rotor 65, 50.000 rpm, por 1 hora. Após cada ultra-centrifugação o precipitado era ressuspenseo em tampão fosfato 0,01 M (pH 7,4), contendo 0,5 M de uréia, e centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos no rotor SS-34 Sorvall. Purificação adicional foi feita pela centrifugação em gradiente de densidade, constituído por 7,7,7 e 4 ml de 10,20,30 e 40% de sacarose, em 0,01 M de tampão fosfato e 0,5 M de uréia. Após a centrifugação, a 22.500 rpm, por 2 horas, em rotor SW 25,1 Beckman, os tubos com os gradientes foram observados em sala escura, fazendo-se passar através dos mesmos um feixe de luz produzido por lâmpada de uma lupa. Os materiais das bandas assim localizadas foram retirados com seringa, separadamente, concentrados por ultracentrifugação, ressuspensos em água e examinados ao espectrofotometro e microscópio eletrônico.

O antissoro foi preparado em coelho, pela injeção intramuscular da preparação com o vírus semi-purificado, emulsificada em igual volume de adjuvante completo de Freund. Foram feitas 6 injeções, com um intervalo de cerca de 20 dias. As sangrias, por punção no coração, iniciaram-se cerca de 40 dias após a primeira aplicação do antígeno. Foram feitas 8 sangrias, com um intervalo de cerca de 10 dias. O sangue obtido foi deixado por 1 hora em temperatura ambiente (20 a 25°C) para coagular, descolado então das paredes de tubo de vidro com um bastão e mantido



por 24 horas em câmara fria ( $\pm 12^{\circ}\text{C}$ ). O antissoro, da parte superior do tubo, foi tirado com seringa, misturado com igual volume de glicerina e conservado em congelador, ou simplesmente conservado em geladeira ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ), sem glicerina.

Testes de microprecipitina em placas e dupla imunodifusão em agar-gel (Ball, 1974), foram usados com o antissoro obtido. Nos testes de microprecipitina, usaram-se, como, antígenos, sucos de folhas de alho Porró sadio e de alho comum infetado. Os sucos foram extraídos das folhas em NaCl 0,85% (1/1; p/v), clarificados com clorofórmio (1/1; v/v) e centrifugados a 3.000 rpm, por 15 minutos, no rotor SS 34 Sorvall. O antissoro e soro normal foram diluídos até 1/1024 em NaCl 0,85%. Nos testes de dupla imunodifusão usou-se, para degradação das partículas do vírus, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) a 0,5% em agar gel contendo 0,8% de agar nobre especial (Difco Lab. Detroit, Michigan - USA) e 1% de azida de sódio, e a 1,5% no tratamento dos antígenos (Purcell & Batchelor, 1977). Os antígenos usados foram: suco de planta oriunda de meristema, suco de folhas de alho Porró, suco de folhas de alho dos clones Roxo e Vila Verde, tampão fosfato 0,01 M, pH 7, usado para extração dos sucos (1/1;p/v) e preparação do vírus semi-purificado. Também foram usados agar-gel e antígenos sem SDS. Soro normal e antissoro, sem glicerina, foram usados nas concentrações originais.

### C.3. Microscopia eletrônica

#### 1. Detecção de partículas supostamente virais e determinação de sua morfologia

Tentativas de detecção de partículas de vírus foram feitas através de preparações "leaf dip", método usado por Brandes (1957) combinado com contrastação negativa, método usado por Kitajima (1965). Fragmentos foliares de plantas dos clones Roxo e Vila Verde foram mergulhados em uma gota de solução a 1% de ácido fosfotungstico, pH 7, mantida em uma superfície parafinada. O material celular dessas folhas que entrara em suspensão, foi a seguir transferido para uma telinha de cobre 200 mesh, coberta com Formvar-carbono, e após eliminar o excesso de líquido e se - car, foi examinada ao microscópio eletrônico. O mesmo foi feito com as plântulas obtidas por cultura de meristemas. Para determinação de características morfológicas, foram tomadas micrografias a aproximadamente 5.000 X, tomando-se também, paralelamente, micrografias do vírus S da batata (PVS), que serviu como padrão. As mensurações foram feitas a 50.000 X.

#### 2. Exames de suspensões obtidas nas tentativas de purificação do vírus de alho.

Os exames das preparações obtidas foram feitos por contrastação negativa, método de Brenner & Horne (1959). Para tal, 1 gota da suspensão foi transferida para a telinha coberta com Formvar-carbono e o excesso removido com papel filtro. Após sêca, foi feita uma rápida lavagem com água bidestilada e colocada uma gota de acetato de uranila a 3%, removendo-se o excesso. Após estar sêca, foi examinada ao microscópio eletrônico.

### 3. Exames de secções histológicas de tecido foliar

A fim de detectar possíveis partículas de vírus ou inclusões induzidas pela infecção, ou ainda outras alterações celulares, foram preparados fragmentos foliares e meristemas com 1 e 2 primórdios foliares, para exames histológicos de secções ultra-finas. Para tal, os tecidos foram fixados em glutaraldeído 2%, em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4, durante 2 horas, e após lavagem em tampão fosfato 0,01 M, fêz-se pós-fixação em  $\text{OsO}_4$  a 1%, em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4, durante 2 horas. Após desidratação em acetona, o tecido foi incluído em Epon 812, seccionado com navalha de diamante ou vidro, contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo e, finalmente, examinado ao microscópio eletrônico.

### III. RESULTADOS

#### A. Tratamento térmico de bulbilhos de alho.

##### 1. Efeito do calor sôbre a sobrevivência dos bulbilhos

Sob calor contínuo, sem unidade, os bulbilhos em dor --  
mência do clone Roxo sobreviveram a 43°C por 1 semana e 39°C por  
2 semanas. O tratamento com unidade afetou mais a sobrevivência  
dos bulbilhos, pois êstes suportaram apenas 39°C por 1 semana,  
e com 2 semanas de tratamento não houve sobreviventes mesmo a  
37°C (Quadro) 4.A). No tratamento contínuo a 39°C com bulbilhos  
dormentes dos clones Roxo e Vila Verde, houve sobrevivência por  
3 semanas apenas de bulbilhos do clone Roxo (Quadro 4.B).

Com calor intermitente, 8 horas nas estufas e 16 horas  
em temperatura ambiente (22 -- 28°C), a sobrevivência de bulbi-  
lhos em dormência do clone Roxo aparentemente não foi afetada,  
mesmo em tratamentos a 50°C por 2 semanas (Quadro 5.A). Porém,  
bulbilhos do clone Vila Verde, com dormência quebrada pela perma-  
nência por mais de 1 mês em câmara fria a 12°C, tiveram a percen-  
tagem de sobrevivência diminuída quando submetidos a 50°C com  
umidade por 1 e 2 semanas, e a sobrevivência foi nula quando se  
usou a mesma temperatura sem unidade (Quadro 5.B).

Nos tratamentos com água quente houve sobrevivência de  
bulbilhos a 55°C por 15 minutos, a 50°C por 30 minutos e a 45°C  
por 5 horas. Os bulbilhos tratados foram do clone Vila Verde e  
estavam com a dormência quebrada pela permanência por mais de 1  
mês em câmara fria a 12°C (Quadro 6).

##### 2. Efeito do calor sobre o vírus.

Os tratamentos térmicos de bulbilhos de alho nas condi-  
ções dos experimentos realizados e com os clones usados, aparen-

Q U A D R O 4

Tratamento térmico contínuo de bulbilhos de alho em dormência.

A. Clone Roxo

Tratamento		Temperaturas (°C)				
Duração	umidade	22 a 28	37	39	41	43
1 semana	com	10*	3	5	0	0
	sem	10	7	9	6	1
2 semanas	com	10	0	0	0	0
	sem	8	7	7	0	0

B. Temperatura de 39°C , a seco

Clones	Duração dos Tratamentos (semanas)				Contrôle (22 a 28°C)
	3	4	5	6	
Roxo	3*	0	0	0	5
Vila Verde	0	0	0	0	6

\* os números representam as plantas obtidas de dez bulbilhos tratados.

Q U A D R O 5

Tratamento térmico intermitente de bulbilhos de alho (8 horas nas estufas e 16 horas em temperatura ambiente -- 22 a 28°C).

A. Clone Roxo, em dormência

Tratamento		Temperaturas (°C)			
Duração	unidade	22 a 28	39	45	50
1 semana	com	9 *	10	8	9
	sem	10	9	10	9
2 semanas	com	10	9	7	8
	sem	9	9	8	9

B. Clone Vila Verde, com dormência quebrada pela permanência por mais de um mês em câmara fria (+ 12°C)

Tratamento		Temperaturas (°C)			
Duração	Unidade	22 a 28	39	45	50
1 semana	com	10*	10	10	7
	sem	10	10	9	0
2 semanas	com	10	9	10	2
	sem	9	8	7	0

\* Os números representam as plantas obtidas de dez bulbilhos tratados.

Q U A D R O 6

Tratamento com água quente, de bulbilhos de alho do clone Viola Verde com dormência quebrada pela permanência por mais de um mês em câmara fria ( $\pm 12^{\circ}\text{C}$ )

Duração	Temperaturas ( $^{\circ}\text{C}$ )				
	22 a 28	40	45	50	55
15 minutos	10*	10	10	6	1
30 minutos	10	10	10	2	0
1 hora	10	10	10	0	0
2 horas	10	10	9	0	0
3 horas	10	10	7	0	0
4 horas	10	10	6	0	0
5 horas	10	9	8	0	0

\* Os números representam as plantas obtidas de dez bulbilhos tratados.

tamente não foram efetivos para inativar o vírus. Todas as plantas que se desenvolveram dos bulbilhos tratados mostraram sintomas de mosaico da mesma intensidade do que as plantas - controle, originadas de bulbilhos não tratados.



## B. Cultura de meristemas apicais de alho

Dos 460 meristemas apicais de bulbilhos de alho utilizados, 135 se desenvolveram, o que representa cerca de 29%, e destes, apenas 59 deram origem a plântulas completas, com raízes e parte aérea bem desenvolvidas, o que significa 12% do total realizado (Quadro 7, 8, 9 e 10).

Das 59 plântulas completas obtidas, foram examinadas 30 ao microscópio eletrônico. Cinco destas, pertencentes aos clones Vila Verde e Anarante, não apresentaram partículas de vírus, estando supostamente sadias (Quadro 7).

O estado fisiológico dos bulbilhos usados para extração dos meristemas não teve influência nas percentagens de plântulas obtidas, porém meristemas originados de bulbilhos brotados e, principalmente, brotados em altas temperaturas, aparentemente tiveram maiores possibilidades de originar plântulas livres de vírus (Quadro 8).

O tipo ou tamanho de meristema utilizado teve grande importância no seu desenvolvimento e na obtenção de plantas saudáveis. Assim, não houve crescimento de meristemas sem primórdio foliar. Dentre os 193 meristemas foliar, 33% deles se desenvolveram e 11% deram origem a plântulas completas, enquanto que dentre os 102 meristemas com 2 primórdios, 71% deles se desenvolveram e 36% deram origem a plântulas completas. Porém, apenas os meristemas com 1 primórdio foliar deram origem a plântulas supostamente livres de vírus (Quadro 9).

O método utilizado não interferiu nas percentagens de plântulas obtidas dos diferentes tipos de meristemas (Quadro 10), porém as plântulas transferidas para areia, método de Wang & Huang (1974), produziram bulbilhos maiores do que as que

Q U A D R O 7

Resultado, por clone, da percentagem de meristemas desenvolvidos, de plântulas obtidas e de plântulas possivelmente sem vírus.

Clones	Meristemas		Plântulas		
	Utilizados	Desenvolvidos	Obtidas	Examinadas ao M. E.	Sem Vírus
Vila Verde	186	82 (44%)	42(22%)	19	4
Branco Mineiro	136	0	0	0	0
Roxo	66	36 (54%)	7(10%)	5	0
Amarante	62	14 (22%)	9(14%)	5	1
Lavínia	10	3 (30%)	1(10%)	1	0
Total	460	135 (29%)	59(12%)	30	5

Q U A D R O 8

Efeito do estado fisiológico dos bulbilhos sobre a percentagem de plântulas obtidas e plântulas sem vírus.

Bulbilhos	Meristemas		Plântulas obtidas	Plântulas	
	Utilizados	Desenvolvidos		Examinadas ao M. E.	Sem Vírus
com dormência	66	36 (54%)	7(10%)	5	0
Brotados em câmara fria (± 12%)	356	92 (25%)	48(13%)	23	4
Brotados em câmara de cresci- mento (24 e 33°C)	38	7 (18%)	4(10%)	2	1
Total	460	135 (29%)	59(12%)	30	5

Q U A D R O 9

Efeito do tipo ou tamanho do meristema sobre seu desenvolvimento e sobre a percentagem de plântulas obtidas e sem-vírus.

Tipos	Utilizados	Desenvolvidos	Obtidas	Examinadas ao M. E.	Sem Vírus
sem primórdio foliar (100 a 200 micrômetros)	165	0	0	0	0
com 1 primórdio foliar (300 a 400 micrômetros)	193	64 (33%)	23(11%)	12	5
com 2 primórdios foliares(500 a 600) micrômetros)	102	71 (71%)	36(36%)	18	0
Total	460	135 (29%)	59(12%)	30	5

Q U A D R O 10

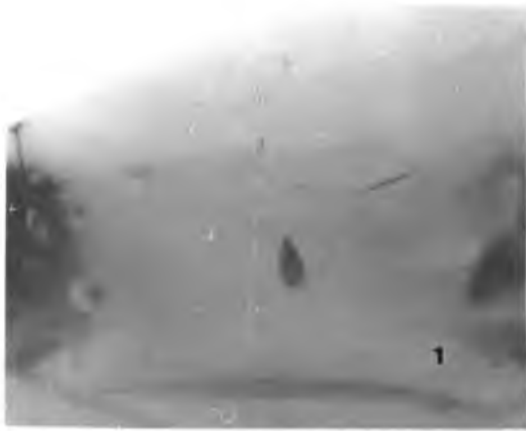
Resultados obtidos na cultura de meristemas, pela utilização dos métodos de Wang & Huang (1974) e de Quiot et al. (1972).

Método.	Meristemas			Plântulas		
	Tipos	Utilizados	Desenvolvidos	Obtidas	Examinadas ao M. E.	Sem Vírus
Wang & Huang (1974)	sem primórdio foliar	149	0	0	0	0
	com 1 primórdio foliar	57	16 (28%)	5 (8%)	3	1
	com 2 primórdios foliares	24	17 (70%)	11 (45%)	5	0
Quiot <u>et al</u> (1972)	sem primórdio foliar	16	0	0	0	0
	com 1 primórdio foliar	136	48 (35%)	18 (13%)	9	4
	com 2 primórdios foliares	78	54 (69%)	25 (32%)	13	0
Total		460	135 (29%)	59 (12%)	30	5

permaneceram nos frascos, método de Quiot et al. (1972).

Frascos pequenos para os meristemas recém extraídos foram melhores, pois ocuparam menor espaço e levaram menor quantidade de meio de cultura. Tubos de ensaio de 0,8 x 7 cm, ou vidros de remédio pequenos, serviram perfeitamente. Neles as plântulas permaneceram cerca de um mês pelo método de Wang & Huang (1974) e dois meses pelo método de Quiot et al. (1972). Frascos maiores, tipo "french square" com capacidade para 50 ml (Fig 2.3) ou tubos de ensaio grandes (Fig 2.4), foram usados a partir de então.

Fig. 2: Fases do desenvolvimento de meristemas apicais de bulbilhos de alho: 1) Meristema com alguns dias de desenvolvimento; 2) Plântula com cerca de 20 dias; 3) Plântulas com cerca de 40 dias; 4) Plântulas com cerca de 60 dias; 5) Plântula com cerca de 70 dias transferida para copo com areia; 6) Bulbilhos obtidos após 3 meses de cultura.





## C. Diagnose do vírus em alho

### C.1. Inoculações em plantas-teste.

Os resultados obtidos da inoculação mecânica de 26 espécies e variedades de plantas-teste, pertencentes a 6 diferentes famílias (Quadro 3) foram negativos na diagnose do vírus por esse método. Nos testes efetuados, apenas algumas plantas de Chenopodium quinoa Willd. se apresentaram com lesões locais nas folhas, caracterizadas por manchas cloróticas de 2 a 3 mm de diâmetro, quando inoculadas por esfregação com os dedos, usando suco de folhas extraído em tampão fosfato a 0,01 M, pH 7 e carborundum como abrasivo. O aparecimento dos sintomas se deu entre 7 e 10 dias após a inoculação. Porém, nem todas as plantas inoculadas pelo mesmo método mostraram sintomas, demonstrando ser o vírus de transmissão difícil e inconsistente.

Tampouco, não houve efeito da adição de anti-oxidantes ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 2-mercaptoctanol, sulfato de nicotina e cafeína) e do uso de tampões com pH e molaridades diferentes de 7 e 0,01 M, respectivamente.

Os testes de inoculação por meio do afídio M. persicae, utilizando 8 variedades de cebola (A. cepa) entre elas algumas comprovadamente susceptíveis ao OYDV, deram resultados aparentemente negativos, não havendo manifestação de sintomas.

## C.2. Purificação e serologia

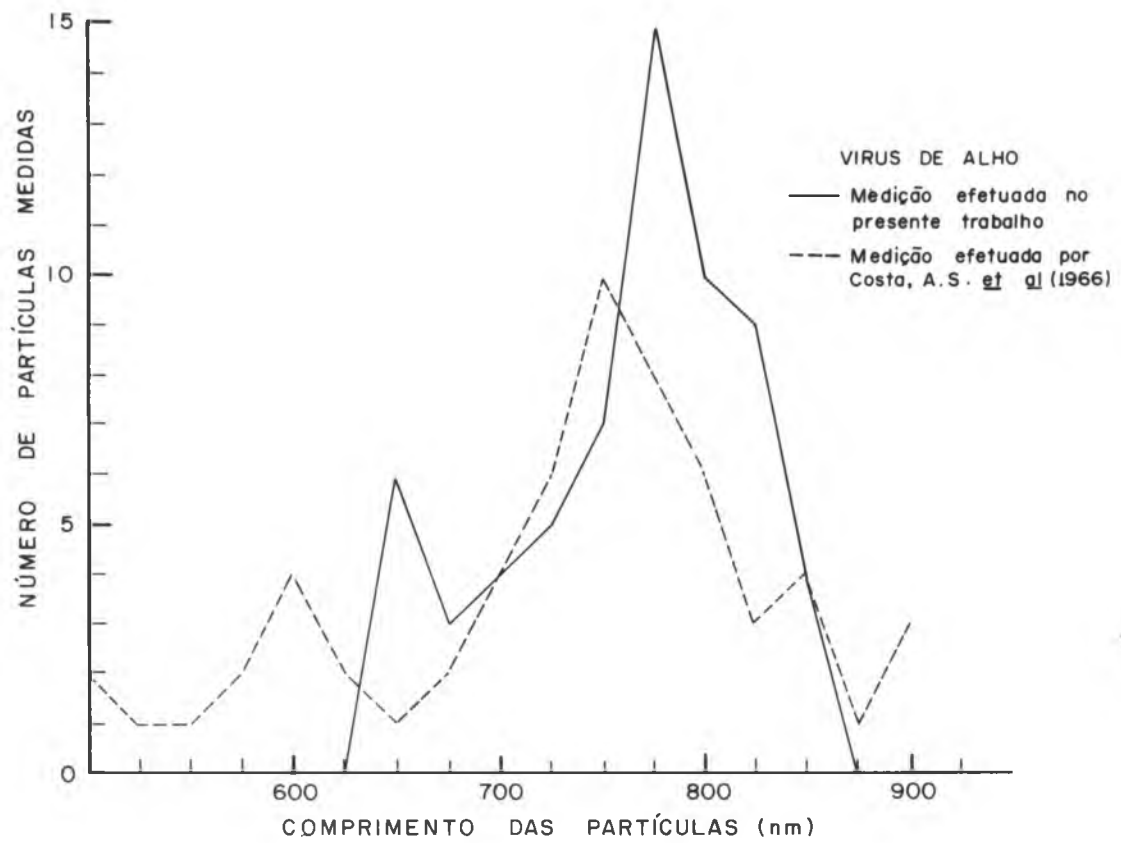
A trituração das folhas de alho e posterior filtração, através de camadas de gaze, foi dificultada pela presença de substância mucilaginosa nos tecidos da planta. Esta dificuldade foi minorada, em parte, usando-se maior volume da solução de extração do suco. Verificou-se que o clone Roxo possui maior quantidade de substância mucilaginosa do que o Vila Verde.

Após a adição e mistura de n-butanol ao suco, e centrifugação a baixa rotação, o sobrenadante apresentou-se com cor castanho clara. Os precipitados obtidos nas ultracentrifugações eram pequenos e de cor castanho clara a amarelo escura.

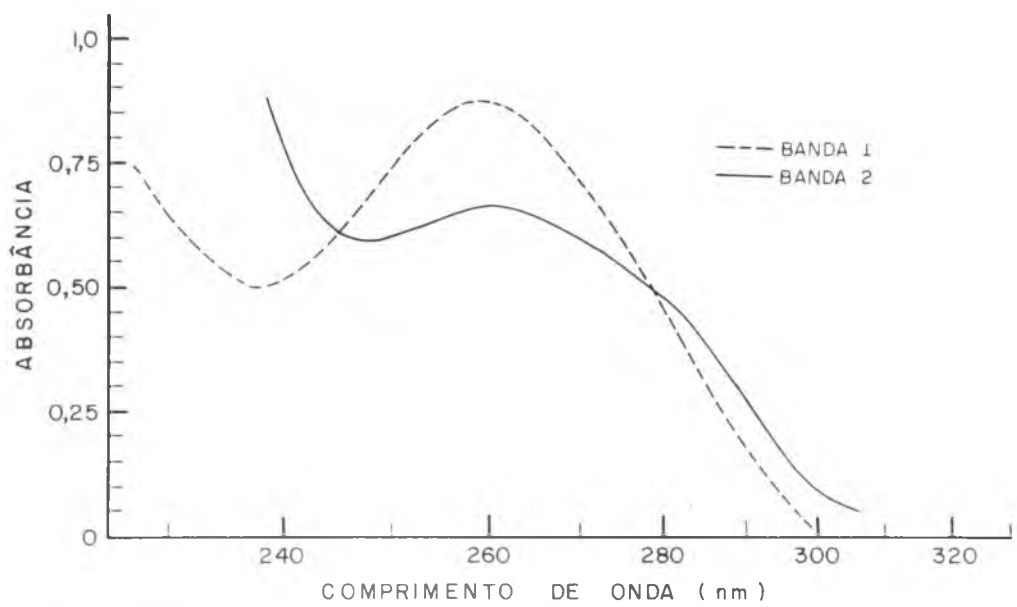
Nos tubos com gradiente de densidade ocorreu a formação de duas bandas, uma a cerca de 20 mm abaixo do menisco (Banda 1) e a outra a cerca de 30 mm (Banda 2). Os materiais retirados destas bandas, quando submetidos ao exame com espectrofotômetro, revelaram curvas de absorção de luz ultra-violeta típicas de núcleo-proteínas (Fig 3.2). Para a Banda 1, houve uma absorção máxima a 260 nm, mínima a 237 nm e relação  $A_{280}/A_{260}$  igual a 0,46, e para a Banda 2, uma absorção máxima a 262 nm, mínima a 247 nm e relação  $A_{280}/A_{260}$  igual a 0,72. Pela tabela de Layne (1957) estes dados indicam núcleo-proteínas com cerca de mais de 20 e 9% de ácido nucleico, respectivamente. Ao exame com microscópio eletrônico, apenas no material da Banda 2 pode-se observar um grande número de partículas, usualmente agregadas extremidade - a - extremidade, e geralmente enoveladas (Fig 4.1). Embora usando sempre a mesma metodologia, algumas vezes não se obteve a formação de bandas no gradiente de sacarose.

Nos testes de microprecipitina em placas, houve a formação de precipitados em todas as diluições do antissoro, quando

Fig. 3: Vírus associado ao Mosaico do Alho: 1) Diagrama com a distribuição das mensurações das partículas; 2) Curvas de absorção de luz ultra-violeta dos materiais das bandas obtidas nas tentativas de purificação do vírus em gradiente de sacarose.

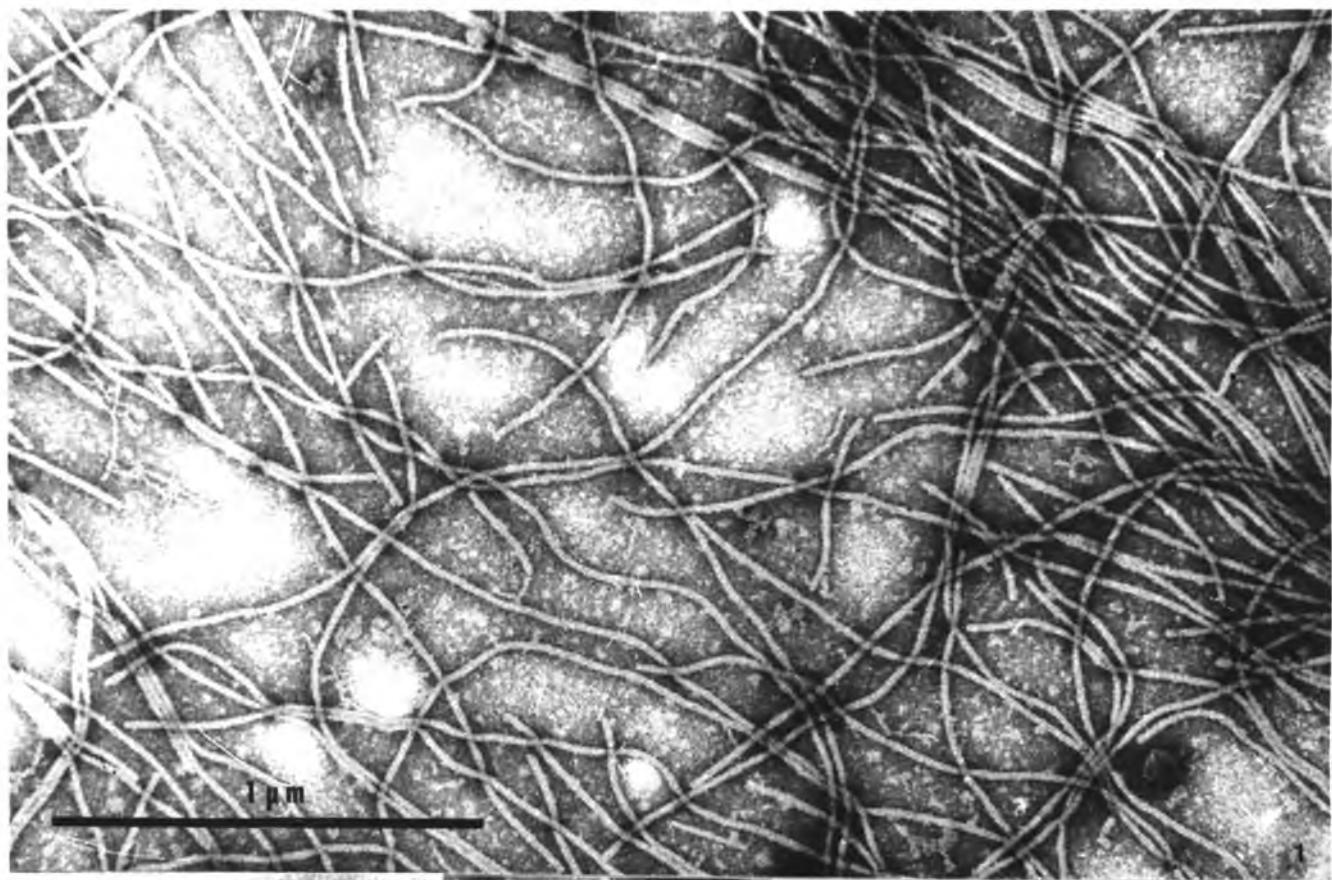


1



2

Fig. 4: Micrografias eletrônicas de partículas e inclusão lamelar associadas ao Mosaico do Alho: 1) Preparação semi-purificada; 2) Inclusão lamelar associada à doença em preparação "leaf dip"; 3) Partículas alongadas em preparação "leaf dip".



se usou suco de fôlhas de alho como antígeno; porém apenas as duas primeiras diluições do antissoro, 1/2 e 1/4 respectivamente, formaram precipitados, quando se usou suco de fôlhas de alho Porró. Nos testes de dupla imunodifusão em agar-gel (Fig. 5) ocorreram linhas de precipitina, indicando as seguintes reações:

- Agar-gel e antígenos sem SDS

Reação do Antissoro (AS) com suco de alho dos clones Roxo e Vila Verde.

- Agar-gel sem e antígenos com SDS

Reação do AS com preparação do vírus semi-purificado.

- Agar-gel com e antígenos sem SDS

Reação fraca do AS com preparação do vírus semi-purificado.

- Agar-gel e antígenos com SDS

Reação do AS com preparação do vírus semi-purificado.

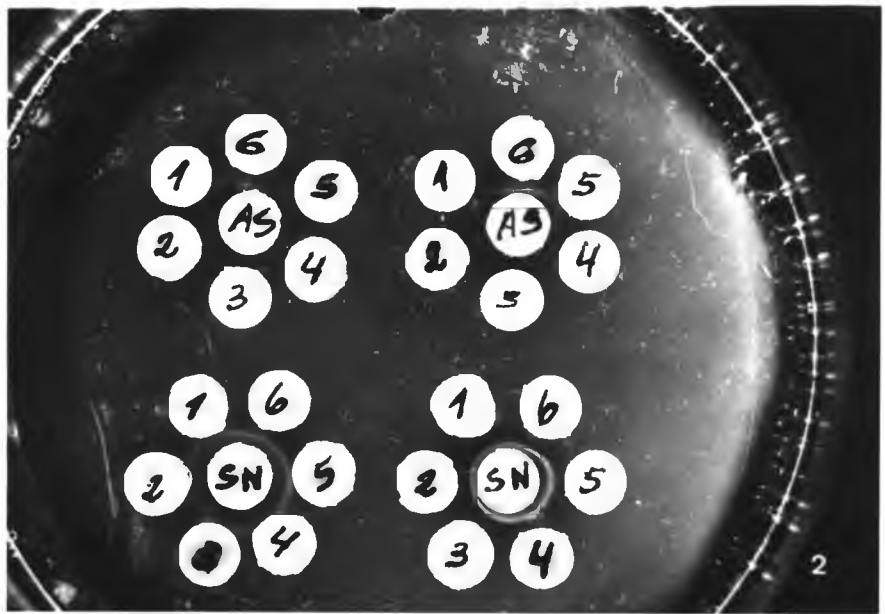
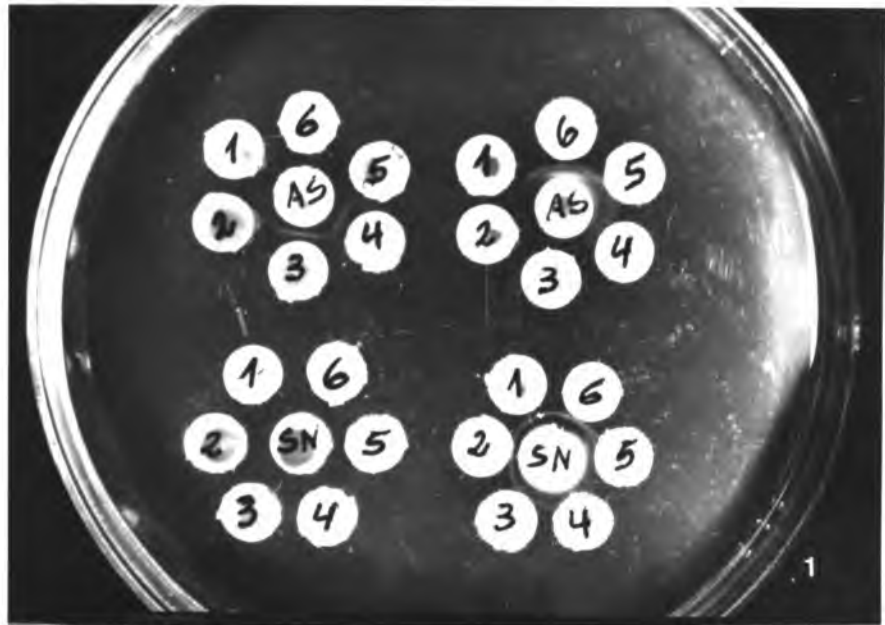
Com o soro normal houve formação de linhas de precipitina circulares, indicando reações não específicas, quando se usou SDS no agar-gel e, ou nos antígenos.

Fig. 5: Testes de dupla imunodifusão em agar-gel do antissoro obtido contra o vírus associado ao Mosaico do Alho: 1) Placa sem SDS; 2) Placa com SDS. Antígenos usados: 1) Suco de plântula originada de cultura de meristemas; 2) Suco de folhas de alho Porró; 3 e 4) Suco de folhas de alho dos clones Roxo e Vila Verde, respectivamente; 5) Tampão fosfato 0,01 M, usado para extração dos sucos; 6) Preparação com o vírus semi-purificado.

Nos conjuntos de furos das placas à direita, os antígenos foram tratados com SDS a 1,5%

SN = soro normal ; AS = antissoro.





### C.3. Microscopia eletrônica

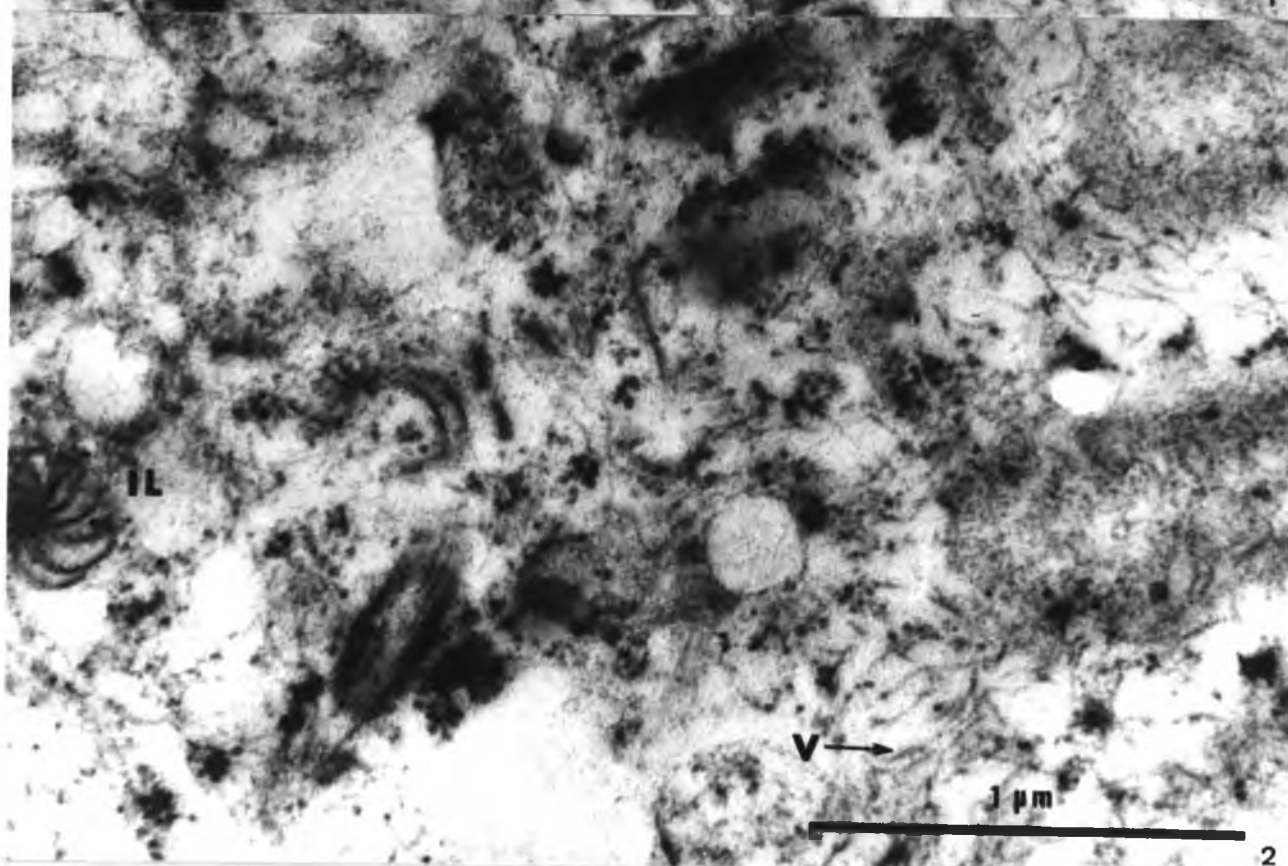
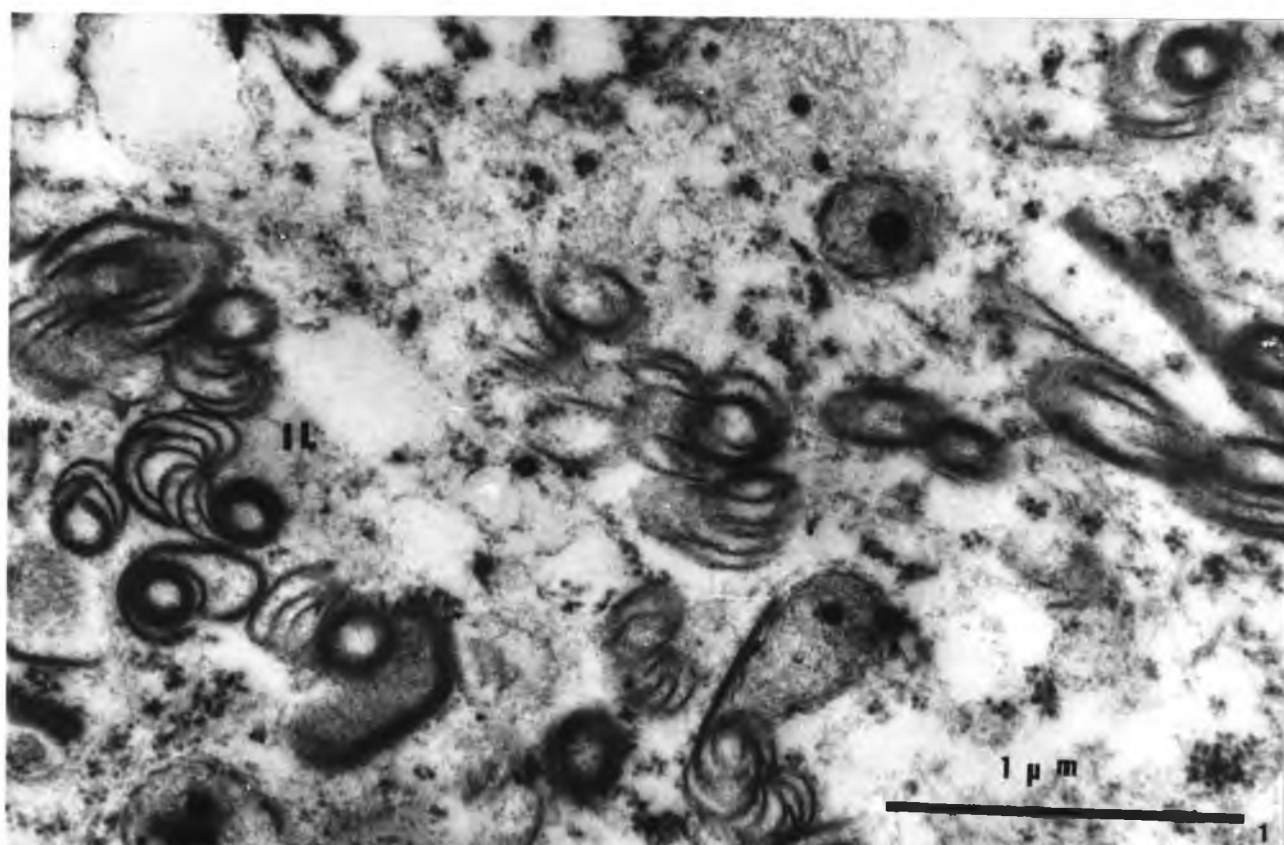
Partículas alongadas e flexíveis, de cerca de 15nm de diâmetro e comprimento variando entre 600 - 900 nm, similares às dos Potyvirus, foram consistentemente detectadas nas preparações "leaf dip", feitas com folhas dos clones de alho Roxo e Vila Verde. Eventualmente, foram observadas formações lamelares, com periodicidade, e que provavelmente representam as inclusões lamelares típicas da infecção por Potyvirus (Fig 4.2 e 6.1).

O comprimento normal (modal) baseado na curva de distribuição dos tamanhos das partículas, usando o PVS como padrão, deu um valor da ordem de 774 nm, tendo sido medidas 60 partículas. Houve um pico secundário na curva de distribuição em torno de 650 nm (Fig 3.1).

Foram examinadas 30 plântulas originárias de cultura de meristemas. Todas as de meristemas com 2 primórdios foliares continham as partículas alongadas do tipo Potyvirus, mas em 5 plântulas, 40% das derivadas de meristema com 1 primórdio foliar não se pode detectar as partículas apesar de um re-exame do material.

Nas seções histológicas dos tecidos foliares foram consistentemente notadas inclusões lamelares típicas dos Potyvirus, as quais, em seções, produziam configurações variadas como linhas curvas ou retas e paralelas, ou ainda "cataventos" (Fig. 6.2). Em algumas seções, pode-se notar também certas áreas citoplasmáticas contendo material fibrilar, possivelmente as partículas alongadas in situ. (Fig 6.1). Não se observaram alterações marcantes nas células, apesar da presença dessas partículas e/ou inclusões lamelares.

Fig. 6: Micrografias eletrônicas de seções ultra-finas dos tecidos de folhas de alho com sintomas de mosaico: 1) Inclusões lamelares (IL) associadas à doença, do tipo induzido pelos Potyvirus; 2) Partículas alongadas (V) dispersas no citoplasma.



#### IV. DISCUSSÃO

Bawden (1966), citado por Nyland & Goheen (1969), relatou que qualquer vírus poderia ser inativado in vivo pelo calor, desde que se usasse o tratamento adequado. Porém, com vírus de alho ainda não se conseguia determinar um tratamento térmico efetivo, embora neste trabalho os bulbilhos tivessem suportado temperaturas relativamente altas, 43°C em calor contínuo e 50°C em calor intermitente (8 horas na estufa e 16 horas em temperatura ambiente - 22 a 28°C), por períodos de tempo de 1 e 2 semanas, respectivamente.

Em tratamento contínuo a 39°C os bulbilhos suportaram 3 semanas, não havendo, aparentemente, efeito sobre o vírus. No entanto, é possível que tratamentos de bulbilhos em temperaturas um pouco mais baixas e por períodos mais longos promovam a inativação do vírus. Referências do uso deste tipo de tratamento na terapia de viroses de diversas plantas são citadas por Nyland & Goheen (1969).

Lin & Lo (1966), citados por Nyland & Goheen (1969), notaram uma maior tolerância dos tecidos de plantas ao calor úmido. Para os bulbilhos de alho testados esta afirmativa foi válida quando se usou tratamento intermitente, porém, com tratamento contínuo, o calor úmido prejudicou mais os bulbilhos do que o calor seco.

A informação de Nyland & Goheen (1969), de que a sobrevivência aumenta com o uso de calor intermitente, foi confirmada neste trabalho.

Não foi conseguido desenvolvimento de meristemas apicais de alho sem primórdio foliar, embora Wang & Huang (1974), tenham relatado a utilização destes meristemas na regeneração de cultivares de alho infetados por vírus. Como os meristemas deste

tipo são muito pequenos (100 a 200 micrômetros, e a operação de extração mais demorada, é provável que tenha ocorrido desidratação irreversível dos mesmos, antes de colocá-los nos frascos com os meios de cultura.

Quiot et al (1972), usando meristemas com um primórdio foliar, conseguiram uma percentagem de recuperação de plantas saudias a partir de bulbilhos infetados, da ordem de 3,3%. Usando o método descrito por êsses autores e o método de Wang & Huang, (1974), conseguiu-se, com meristemas de um primórdio foliar, menos de 5% de plântulas supostamente saudias, em relação ao número total de meristemas deste tipo utilizados.

Segundo Kassanis (1972), quanto maior o meristema, maior a chance de se desenvolver, porém menor a probabilidade de originar plantas livres de vírus. Meristemas de alho com dois primórdios foliares (500 a 600 micrômetros) se desenvolveram em muito maior percentagem (70%) do que os com um primórdio foliar (33%), porém nenhuma plântula obtida dos primeiros, revelou-se livre de vírus.

Quiot et al (1972) não fazem referência ao estado fisiológico dos bulbilhos de alho dos quais foram retirados os meristemas para cultura, porém Wang & Huang (1974) usaram bulbilhos brotados, conforme citam em seu trabalho. Por sua vez, Quak (1961) afirma que em temperaturas mais altas a multiplicação de alguns vírus é inibida ou se dá mais lentamente, podendo-se obter partes de plantas livres de vírus, mantendo-as em ambientes com temperaturas altas. No presente trabalho, usando-se meristemas com diferentes estados fisiológicos, obteve-se percentualmente, mais plântulas supostamente livres de vírus de meristemas extraídos de bulbilhos brotados em câmara de crescimento (25 e 33°C, temperatura noturna e diurna respectivamente), do que de bulbilhos brotados em câmara fria (+ 12°C). Nenhuma plântula originada de meristema extraído de bulbilho

dormente estava supostamente livre de vírus.

Brierley & Smith (1946) relataram a transmissão mecânica e pelo afídio Myzus persicae Sulz. de um vírus de alho para dezenove cultivares de cebola. Nos testes efetuados, no presente trabalho, usando-se dez cultivares de cebola, alguns comprovadamente susceptíveis ao Onion Yellow Dwarf Vírus, como demonstraram Costa et al. (1966), não se conseguiu a transmissão do vírus do alho, ou, pelo menos, as plantas inoculadas não apresentaram sintomas que as distinguíssem das plantas - controle. Ahlawat (1974) também obteve resultados negativos ao tentar a transmissão de um vírus de alho para cebola.

O aparecimento de lesões locais cloróticas em apenas algumas das plantas de Chenopodium quinoa inoculadas, coincide com o relato feito por Cadilhac et al. (1976), de que as transmissões de vírus de alho são inconsistentes.

Messiaen & Marrou (1965) mencionaram a realização de semi-purificação do vírus de folhas de alho através da precipitação fracionada com sulfato de amônio, e a obtenção de antissoro que reagia com proteínas normais do hospedeiro. Neste trabalho, a semi-purificação do vírus foi efetuada com centrifugações diferenciais e em gradiente de densidade de sacarose, mas os testes do antissoro, embora prejudicados pela inexistência de plantas sadias de alho para um controle adequado, sugerem também a presença de anticorpos contra proteínas normais do hospedeiro.

A ocorrência de baixas concentrações de vírus no alho em certas fases do ciclo da planta foi mencionada por Cadilhac et al. (1976). Essa menção poderia explicar, em parte, a inconsistência observada nas purificações do vírus. Outra possível causa seria a perda de grande parte das partículas durante o processo de purificação, pela agregação e precipitação, pois,

embora usando uréia como desagregante em todas as fases da purificação (Danirdagh & Shepherd, 1970), as micrografias das uspenções do vírus mostraram partículas ligadas e enoveladas. Modificações nos tipos de desagregante e tampão usados na purificação poderão ser feitas como tentativa de melhorar o processo.

Como foram observadas diferenças entre os dois clones de alho usados, quanto à presença de substância mucilaginosa que dificulta a trituração, sugere-se a realização de estudo dos diversos clones, para determinar os que oferecem maiores facilidades de purificação, tanto no que se refere ao processamento, como na obtenção de maiores concentrações do vírus.

Cadilhac et al. (1976), através da microscopia eletrônica, caracterizaram dois vírus diferentes infectando alho, na França, um Poty e um Carlavirus respectivamente. Neste trabalho, nos clones e amostras examinados, não se encontraram evidências claras da ocorrência de mais de um tipo de partícula de vírus. A presença de dois picos no diagrama de distribuição dos tamanhos das partículas, também observado no trabalho de Costa, et al. (1966) (Fig. 3.1), constitui uma evidência muito fraca, ainda mais que o número total de partículas medidas nos dois casos foi muito baixo.

Wang & Huang (1974) e Quiot et al. (1972), em seus trabalhos de cultura de meristemas de alho, realizaram a diagnose pela sintomatologia das plantas. Porém, na primeira geração de plantas obtidas de meristemas, as folhas são muito pequenas e os sintomas de difícil observação. Neste trabalho, a diagnose foi efetuada ao fim da primeira geração das plântulas obtidas, através de exames ao microscópio eletrônico. O método permitiu uma seleção ainda na primeira geração, e as plântulas infectadas, que escaparam a este crivo, poderão ser testadas novamente nas gerações seguintes.



## V. RESUMO

Plantas de alho, originadas de bulbilhos naturalmente infetados por um Potyvirus e tratados a 39°C por 3 semanas e 43°C por 1 semana (calor seco e contínuo), ou a 50°C por 2 semanas (calor úmido e intermitente), ou ainda a 45°C por 5 horas e 50°C por 30 minutos (água quente), apresentaram sintomas de mosaico, revelando que êsses tratamentos térmicos não foram efetivos para inativar o vírus.

Cultura de meristemas apicais de bulbilhos foi feita, seguindo-se, basicamente, metodologias usadas por Quiot et al. (1972) e Wang & Huang (1974). Não houve desenvolvimento das meristemas extraídos sem primórdio foliar (tamanhos variando entre 100 a 200 micrômetros). Dos meristemas extraídos com 1 primórdio foliar (300 a 400 micrômetros) e 2 primórdios foliares (500 a 600 micrômetros) 33 e 71% deles, respectivamente, se desenvolveram. Partículas do vírus foram observadas em todas as plântulas examinadas, com exceção de 40% das plântulas originadas de meristemas com 1 primórdio foliar.

Embora de maneira inconsistente, Chenopodium quinoa Willd. foi a única planta que mostrou lesões locais cloróticas nos testes de inoculação mecânica. O vírus não foi transmitido mecanicamente ou pelo afídio Myzus persicae Sulz. para cultivares de cebola susceptíveis ao vírus do Mosaico-em-Faixas da cebola (OYDV).

A purificação parcial do vírus foi obtida por centrifugações diferenciais e em gradiente de densidade de sacarose. Ao espectrofotômetro, a preparação do vírus obtida revelou uma absorção máxima a 262 nm e mínima a a 247 nm, com A260/A280 igual a 1,37. Os testes do antissoro obtido foram prejudicados pela inexistência de alho sadio para controle.

A microscopia eletrônica revelou-se como o único método viável para diagnose do vírus do alho, em plântulas de primeira geração, originadas de cultura de meristemas.

## VI. SUMMARY

Garlic plants, originated from cloves naturally infected with a Potyvirus and treated at 39°C for 3 weeks and 43°C for 1 week (continuous dry heat), or at 50°C for 2 weeks (intermittent wet heat) or at 45°C for 5 hours and at 50°C for 30 minutes (hot water treatment), presented symptoms of mosaic which indicated that these heat treatments were not effective in inactivating this virus.

The meristem tip cultures of garlic cloves were obtained basically according to the methods used by Quiot et al. (1972) and Wang & Huang (1974). No development was observed for the meristems without foliar primordium (100 to 200 micrometers), while 30% of the meristems with one foliar primordium (300 to 400 micrometers) and 70% of the meristems with two foliar primordia (500 to 600 micrometers) grew in the culture medium. Virus particles were observed in all garlic plants examined with the exception of 40% of the garlic plants originated from meristems with one foliar primordium.

In the mechanical inoculation tests, Chenopodium quinoa Willd was the only plant which showed chlorotic local lesions, although these symptoms were inconsistent. The virus was not transmitted mechanically or by the aphid Myzus persicae Sulz. to cultivars of onion which are susceptible to Onion Yellow Dwarf Virus.

Partial purification of this virus was achieved by differential centrifugation and sucrose density gradient centrifugation. The U.V. spectrum of the virus preparation was characteristic of nucleo-protein with maximum absorbance at 262 nm, minimum at 247 nm and A260/A280 equal to 1,37. The serological tes

ts with the anti-serum obtained were made more difficult by the lack of healthy garlic leaves as control.

Electron microscopy proved to be the only reliable method to detect garlic virus in the first generation of garlic plants grown from the meristems.

VII. BIBLIOGRAFIA

- AHLAWAT, Y.S. A mosaic disease of garlic in Darjeeling hills. Science and Culture 40: 466-467. 1974.
- AICONERO, R., SANTIAGO, A.G., MORALES, F. & RODRIGUEZ, F. Meristem tip culture and virus indexing of sweet potatoes. Phytopathology 65: 769-773. 1975.
- BAKER, K.F. Thermotherapy of planting material. Phytopathology 52: 1244-1255. 1962.
- BALL, E.M. Serological tests for the identification of plant viruses. Amer. Phytopath. Soc. 1974. 31 p.
- BARNETT, O.W., DE ZOETEN, G.A. & GAARD, G. Bearded Iris Mosaic Virus: transmission, purification, inclusions and its differentiation from Bulbous Iris Mosaic. Phytopathology 61: 926-932. 1971.
- BERG, L.A. & BUSTAMANTE, M. Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free bananas. Phytopathology 64: 320-322. 1974.
- BRANDES, J. Eine elektronenmikroskopische schnellmethode zum Nachweis faden - und stäbchen förmiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkelkeimen. Nachr. bl. dtsh. Pfl. Schtzd., Braunschweig 9: 151-152. 1957.
- BRASIL. Centro de informações economico-fiscais. Comércio Exterior do Brasil. Importação. v.1. Rio de Janeiro. Gráfica IBGE. 1974.

BRENNER, S. & HORNE, R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biophys. Biochim. Act.* 34: 108-110. 1959.

BRIERLEY, P. & SMITH, P.F. The perennial tree onion a carrier of Onion-Yellow Dwarf Virus. *Phytopathology* 34: 506-507. 1944.

\_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Reaction of onion varieties to Yellow Dwarf Virus and to three similar viruses isolated from shallot, garlic and narcissus. *Phytopathology* 36: 292-296. 1946.

\_\_\_\_\_ & STUART, N.W. Influence of nitrogen nutrition on susceptibility of onions to Yellow Dwarf Virus. *Phytopathology* 36: 297-301. 1946.

CADILHAC, Brigitte, QUIOT, J.B. MARROU, J. & LEROUX, J. P. Mise en évidence au microscope électronique de deux virus différents infectant l'ail (Allium sativum L. ) et l'échalote (Allium cepa var. Ascalonicum). *Ann. Phytopath.* 8: 65-72. 1976.

CARVALHO, S.M. Raides alho mais perto da meta final. *Ext. Rural* 5: 3-6. 1970.

COSTA, A.S. Informações pessoais 1977.

\_\_\_\_\_, COSTA, C.L., NAGAI, H. & KITAJIMA, E.W. Cebolinha de Cheiro, fonte do vírus do Mosaico - em Faixas da Cebola. *O Biológico* 37: 157-159. 1971.

\_\_\_\_\_, KITAJIMA, E.W. & NAGAI, H. Ocorrência do Mosaico-em-Faixas na cebola no Brasil. *R. Olericultura* 6: 67-74. 1966.

DAMIRDAGH, I.S. & SHEPHERD, R.J. Purification of the  
Tabacco Etch and Other Viruses of the Potato Y Group.  
Phytopathology 60: 132 - 142. 1960

DHINGRA, K.L. & NARIANI, T.K. A virus disease of onion.  
Ind. Phytopath. 16: 311-312. 1963.

D'OLIVEIRA, Maria de L. Um vírus das Liliaceas em Por-  
tugal. Agron. Lusitana 3: 115-120. 1941.

DRAKE, C.J., TATE, H.D. & HARRIS, H.M. The relationship  
of aphids to the transmission of Yellow Dwarf of  
Onion. J. Econ. Entomol. 26: 841-846. 1933.

FRAZIER, N.W., VOTH, V. & BRINGHURST, R.S. Inactivation  
of two strawberry virus in plants grown in a natural  
high-temperature environment. Phytopathology 55:  
1203-1205. 1965.

FULTON, R.W. Recent advances in vírus purification. III  
Int. Symp. Virus Dis. Crn. Plants. Techn. Commun. of  
Ishs Int. Sec. for Hort. Sci. 36: 93-104. 1974.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA  
-IBGE. Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro,  
Gráfica IBGE 1975.

GNUTOVA, R.V. & KRYLOV, A.V. Potato A - virus diagnosis  
by serological methods. Phytopath. Z. 83: 311-319.  
1975.

- HAASIS, F.A. Studies on narcissus mosaic. Cornell Univ. Agric. Exper. Stat. Mem. 224. 1939. 22 p..
- HARRISON, B.D., FINCH, J.T., GIBBS, A.J., HOLLINGS, M. , SHEPHERD, R.J., VALENTA, V. & WETTER, C. Sixteen groups of plant viruses. Virology 45: 356-363. 1971.
- HAVRÁNEK, P. The virus - free garlic clones obtained from meristematic cultures. Ochrana Rostlin 8: 291 - 298. 1972.
- HENDERSON, W.J. Varietal susceptibility, distribution, and control of Yellow Dwarf of Onions. Phytopathology 21: 123 (Abstr.). 1931.
- \_\_\_\_\_. Studies of the properties and host reaction of the onion to the Yellow Dwarf Virus . Phytopathology 22: 11 (Abstr.). 1932.
- \_\_\_\_\_. Yellow Dwarf, a virus of onions, and its control. Iowa Agr. Exper. Stat. Res. B. 188: 211-255. 1935.
- HORVAT, F. & VERHOYEN, M. Inclusions in mesophyll cells induced by a virus causing chlorotic streaks on leaves of Allium porrum L. Phytopath. Z. 83:328-340. 1975.
- KADO, C.I. Mechanical and biological inoculation principles. In Kado, C.I. & Agrawal, H.O., Eds. Principles and techniques in plant virology. New York. Van Nostrand Reinhold Co. 1972. p. 3-31.



KASSANIS, B. Heat inactivation of Leaf-Roll Virus in potato tubers. *Ann. Appl. Biol.* 37: 339-341. 1950.

\_\_\_\_\_. Effects of changing temperature on plant virus diseases. *Adv. Vir. Res.* 4: 221-241. 1957.

\_\_\_\_\_. Plant tissue culture. In Maramorosch, K. & Koprowski, H., Eds. *Methods in virology*. New York. Acad. Press. 1972. v.1. p.537-566.

KITAJIMA, E.W. Microscopia eletrônica de vírus de plantas. *Técnicas gerais. Ciência e Cultura.* 16: 233-234 (Abstr.). 1964.

\_\_\_\_\_. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. *J. Electron Microscopy (Tokyo)* 14: 119-121. 1965.

\_\_\_\_\_. Combinação dos métodos de "dipping" e contração negativa para identificação rápida de alguns vírus esféricos de planta ao microscópio eletrônico. *Ciência e Cultura* 17: 184(Abstr.). 1965.

LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In Colowich, S.D. & Kaplan, N.O., Eds. *Methods in enzymology*. New York. Acad. Press 1957. v.3. p. 447-454.

LEAR, B. & JOHNSON, E. Treatments for eradication of Ditylenchus dipsaci in cloves of garlic. *Plant. Dis. Rep.* 46: 635-639. 1962.

LORBEER, J.W. Occurrence of Onion Yellow Dwarf Virus in seed and set-grow onions and in onion seed fields in New York. Plant Dis. Rep. 42: 941-942. 1964.

LOUIE, R. & LORBEER, J.W. An effective procedure for the mechanical transmission of Onion Yellow Dwarf Virus. Phytopathology 55: 129(Abstr.). 1965.

\_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Mechanical transmission of Onion Yellow Dwarf Virus. Phytopathology 56: 1020 - 1023. 1966.

\_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Mechanical transmission of Onion Yellow Dwarf Virus to mother onion bulbs. Plant Dis. Rep. 52: 581-582. 1968.

MANN, L.K. Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. Hilgardia 21: 195-251. 1952.

\_\_\_\_\_ & MINGES, P.A. Growth and bulbing of garlic (Allium sativum L.) in response to storage temperature of planting stocks, day length, and planting date. Hilgardia 27: 385-419. 1958.

MARROU, J. Regeneration de plantes a partir de lots de semences infectées. Rel. III Congr. da União Fitopatol. Med. p. 105-117. 1972.

\_\_\_\_\_, DECLANT, T. & LEROUX, J.P. Epidemiologie du virus de la mosaïque de l'ail. Act. III Congr. da União Fitop. Med. p. 53-55. 1972.

- \_\_\_\_\_, LEROUX, J.P., JOUBERT, J.P. & FOURNIER, B. Sélection sanitaire des semences d'ail en France. Act. III Congr. da União Fitopat. Med. p. 463-468. 1972.
- MATTOSO, M.J., REZENDE, A.M., LAD NETO, A., SOUSA, A. F. & BRANDT, S.A. Integração do mercado de alho no estado de Minas Gerais. R. Ceres 21: 30-37. 1974.
- MC WHORTER, T. Cell inclusions in Onion Yellow Dwarf. Phytopathology, 27: 1627-1628. 1937.
- MELHUS, I.E. & HENDERSON, W.J. The Yellow Dwarf of Onions. Phytopathology 19: 86(Abstr.). 1929.
- \_\_\_\_\_, REDDY, C.S., HENDERSON, W.J. & VESTAL, E. A. A new virus disease epidemic on onions. Phytopathology 19: 73-77. 1929.
- MELLOR, F.C. & STACE - SMITH, R. Eradication of Potato Virus X by thermotherapy. Phytopathology 57:674-678. 1967.
- MESSIAEN, C.M. & MARROU, J. Sélection sanitaire de l'ail : deux solutions possibles au probleme de la mosaïque de l'ail, plantes sensibles saines, ou plantes virosées tolérantes. I Journ. Phytopath. Phytopharm. Circumméd. p. 204-207. 1965.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ & LEROUX, J.P. Sélection sanitaire chez les Allium cultivés reproduits par voie végétative. Act. I Congr. de L'Union Phytopath. Méd. p. 510-554. 1966.

- MORALES, F.J. & ZETTLER, F.W. Characterization and electron microscopy of a Potyvirus infecting Commelina diffusa. *Phytopathology* 67: 839-843. 1977.
- MOREL, G., MARTIN, C. & MULLER, J.F. La guérison des pommes de terre atteintes de maladies a virus. *Ann. Physiol. Vég.* 10: 113-139. 1968.
- MULLIN, M. Tissue culture of some monocotyledonous plants. *Austral. J. Biol. Sci.* 23: 473-477. 1970.
- MULLIN, R.H., SMITH, S.H., FRAZIER, N.W., SCHLEGEL, D. E. & MC CALL, S.R. Meristem culture froes straw - berries of Mild Yellow Edge, Pallidosis, and Mottle Diseases. *Phytopathology* 64: 1425-1429. 1974.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497. 1962.
- NYLAND, G. & GOHEEN, A.C. Heat therapy of virus diseases of perennial plants. *Ann. R. Phytopath.* 7: 331-354. 1969.
- PHILLIPS, D.J. Control of Carnation Streak Virus by shoot tip culture. *Phytopathology* 52: 747 (Abstr.). 1962.
- PURCIFULL, D.E., BATCHELOR, D.L. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS) - treated plant viruses and plant viral inclusions. *Univ. Florida. B.* 788. 1977. 39 p.

\_\_\_\_\_, EDWARSON, J.R. & CHRISTIE, S.R. A morphological comparison of inclusions induced by Tobacco Etch and Potato Y viruses. *Phytopathology* 60: 779 - 782. 1970.

\_\_\_\_\_, SHEPHERD, R.J. Preparation of the protein fragments of several rod-shaped plant viruses and their use in agar-gel diffusion tests. *Phytopathology* 54: 1102-1108. 1964.

QUAK, Frederika. Heat treatment and substances inhibiting virus multiplication in meristem culture to obtain virus - free plants. *Adv. Hort. Sci. Appl.* 1: 144 - 148. 1961.

QUIOT, J., MESSIAEN, C.M., MARROU, J. & LEROUX, J.P. Regeneration par culture de meristemes de clones d'ail infectés de façon chronique par le virus de la mosaïque de l'ail. *Act. III Congr. da União Fitopat. Med.* p. 429-433. 1972.

ROBBS, C.F., RIBEIRO, R.L.D., AKIBA, F. & KIMURA, O. Novos estudos sobre o "mal das sete voltas" da cebola (Allium cepa L.) no vale do São Francisco. *Arq.Univ. Fed. Rural do R.J.* 2: 21-27. 1972.

ROJAS, M.B., TEIXEIRA FILHO, A.R., PENNA, J.A. & BARBOSA, T. Análise da oferta de alho em Minas Gerais em 1948-70. *R. Ceres* 22: 159-177. 1975.

RONALD, W.P. & TREMAINE, J.H. Comparison of the effects of sodium dodecyl sulfate on some isometric viruses. *Phytopathology* 66: 1302-1309. 1976.

- SALVARREDI, A.V. Sintomatología del ataque del nematodo Ditylenchus dipsaci (Kuhn) Goodey y su distribución en la planta de ajo. R. Invest. Agrop. Ser. 5. 9: 1-14. 1972.
- SCALOPI, E., VASCONCELOS, E.F.C. & NAKANO, O. Sintomatología de ataque de ácaros à variedades de alho. O Solo 63: 37-38. 1971.
- SHIMOYA, C. Anatomia do bulbo de alho (Allium sativum L.) durante o ciclo evolutivo. R. Ceres 17:102-118. 1970.
- SMALLEY, E.B. The production on garlic by an eriophyd mite of symptoms like those produced by viruses. Phytopathology 46: 346-347. 1956.
- SPACE-SMITH, R. & MELLOR, F.C. Eradication of Potato Viruses X and Y by thermotherapy and axillary bud culture. Phytopathology 58: 199-203. 1968.
- THOMSON, A.D. Heat treatment and tissue culture as a means of freeing potatoes from Virus Y. Nature 177: 709. 1956.
- TOLIN, S.A. Identification of legume viruses in the field by serology. Fitopatologia Brasileira 2: 1-7. 1977.
- VAN REGENMCREEL, M.H.V. Separation of a antigenic plant protein from preparations of plant viruses. Phytopathology 54: 282-289. 1964.

VINE, S.J. Improved culture of apical tissues for production of virus-free strawberries. J. Hort.Sci.43: 293-297. 1968.

WANG, P. & HUANG, L. Studies on the shoot meristem culture of (Allium sativum L.). Horticultura Chinesa 20: 79-87. 1974.

WENT, F.W. Effects of light on stem and leaf growth. Amer. J. Bot. 28: 83-95. 1941.

WETTER, C. Serology in virus-disease diagnosis. Ann. R. Phytopath. 3: 19-42. 1965.