



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

**DIAGNOSE, DISSEMINAÇÃO E EFEITOS
DO COMPLEXO VIRAL DO ALHO (*ALLIUM SATIVUM* L.)
EM REGIÕES PRODUTORAS DO BRASIL**

MICHELLE DE SOUZA FAYAD ANDRÉ

BRASÍLIA-DF

2010

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

**DIAGNOSE, DISSEMINAÇÃO E EFEITOS
DO COMPLEXO VIRAL DO ALHO (*ALLIUM SATIVUM* L.)
EM REGIÕES PRODUTORAS DO BRASIL**

MICHELLE DE SOUZA FAYAD ANDRÉ

Tese apresentada ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

BRASÍLIA-DF

2010

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

Diagnose, disseminação e efeitos fisiológicos do
complexo viral do alho em regiões produtoras do Brasil.

MICHELLE DE SOUZA FAYAD ANDRÉ

Tese apresentada ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do título
de Doutor em Fitopatologia.

Aprovada por:

Renato de Oliveira Resende, Prof. Ph. D.
Universidade de Brasília-Orientador

Cláudio Lúcio Costa, Prof Ph. D.
Universidade de Brasília- Ex. interno

Augusto César Franco, Prof Ph. D.
Universidade de Brasília- Ex. interno

Thor Vinícius Martim Fajardo, Ph. D.
Embrapa Uvas e Vinhos- Ex. externo

Jorge Alberto M. Rezende, Prof Ph. D
ESALQ-EX. externo

FICHA CATALOGRÁFICA

FAYAD-ANDRÉ, M. S. F.

Diagnose, disseminação e efeitos fisiológicos do complexo viral do alho em regiões produtoras do Brasil. [Distrito Federal] 2010. XXX p. (IB/UnB, Doutor, Fitopatologia, 2010). Tese de Doutorado- Universidade de Brasília.

1.Vírus 2.Sondas moleculares 3.RT-PCR 4.Alho 5.Alterações fisiológicas

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

FAYAD-ANDRÉ, M. S. Diagnose, disseminação e efeitos fisiológicos do complexo viral do alho em regiões produtoras do Brasil. Brasília: Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, 2010, XXXp. Tese de Doutorado.

CESSÃO DE DIREITOS

Nome do Autor: Michelle de Souza Fayad André

Título da Tese: Diagnose, disseminação e efeitos fisiológicos do complexo viral do alho em regiões produtoras do Brasil.

Grau: Doutor

Ano: 2010

É concedida à Universidade de Brasília, à Embrapa Hortaliças, permissão para reproduzir esta tese ou emprestá-la apenas para propósitos acadêmicos e científicos.

Michelle de Souza Fayad André

Universidade de Brasília

Departamento de Fitopatologia

Endereço eletrônico: mi_fayad@hotmail.com

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.

Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;

Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;

Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;

Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;

Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;

Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.”

AO ALFA E O ÔMEGA, O PRINCÍPIO E O FIM, ÀQUELE QUE ERA, QUE É, E O QUE HÁ DE VIR ...

DEDICO

Agradecimentos:

Esse é um momento único em que posso expressar com simples palavras a minha profunda gratidão por todos aqueles que nestes 13 anos de UnB me deram a oportunidade de crescer... em todos os sentidos, meu muito obrigada !!!

Aos meus orientadores Renato de Oliveira Resende e André Nepomuceno Dusi pelo apoio, instruções, paciência e dedicação...

Aos professores do Laboratório de Fisiologia Vegetal Augusto César Franco e Lourdes Amaral por acreditarem neste projeto...

Aos mestres que me incentivaram a prosseguir: José Ricardo, Jean Kleber e Adalberto Café.

Aos professores dos Laboratórios de Microscopia Eletrônica e Fitopatologia, em especial: Bergmann Ribeiro, Tatsuya Nagata, Sônia Bão e Cláudio Costa.

Aos pesquisadores e técnicos da Embrapa Hortaliças que estiveram envolvidos com esse trabalho, em especial: Antonio Carlos Moita, Srs. Nivaldo e Lúcio.

Aos funcionários e técnicos da UnB que colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho: César Castro, Sr. Fábio, Dona Francisca, Sr. Francisco, Sr. Arlindo, Elias, Wellington, Ribamar e Silene.

Às queridas amigas Darislene e Gabriela Buzzi meus sinceros agradecimentos.

Ao meu grande amigo Davi Rossato. Obrigada por todo o apoio...

Aos colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica, em especial Raimundo, Virgínia, Anabele, Débora, André Bertran e Misléia...

A todos os amigos da Fitopatologia: Andreza Tomé, Ednalva Patrícia, Rita Pereira, Ana Paula, Fernanda, Érico, Vânia Freitas, Débora Zocolli...

À minha querida e amada amiga Jaira Belle Figueiredo (*In memoriam*) por todo o apoio e ensinamento...

Aos meus pais (Sérgio Fayad e Luzirene) e aos meus parentes que em seus corações torciam por mim, meu muito obrigado!!!

À minha família querida: meu esposo Régis, minhas filhas Ana Carolinna e Nathália e ao João Pedro, vocês são meu maior incentivo. Obrigada pela paciência...amo vocês!!!

ÍNDICE

FICHA CATALPGRÁFICA.....	iv
DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
ÍNDICE GERAL.....	viii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxiii
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1. A cultura do alho.....	1
2. Quadro da alhicultura no Brasil e no Mundo.....	3
3. Problemas fitossanitários.....	6
4. Principais viroses que infectam a cultura do alho no Brasil e no mundo.....	9
4.1. Complexo viral do alho.....	9
4.2. <i>Potyvirus</i>	10
4.3. <i>Allexivirus</i>	11
4.4. <i>Carlavirus</i>	12
5. Efeitos causados pela infecção viral.....	13
5.1. Desenvolvimento de sintomas.....	13
5.2. Efeitos Citológicos (nos componentes celulares).....	14
5.3. Efeitos Fisiológicos e Bioquímicos.....	15
5.4. Injúrias, danos e perdas.....	16
6. Métodos de detecção do complexo viral.....	18
7. Objetivos gerais.....	20

CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS PARA DIAGNOSE DE VÍRUS EM ALHO (<i>Allium sativum</i>).....	23
I) Introdução.....	23
II) Material e Métodos.....	28
1. Recuperação e Manutenção dos clones contendo os genes virais...	28
2. Síntese de oligonucleotídeos e teste de eficiência para a detecção de <i>Potyvirus</i> , <i>Carlavirus</i> e <i>Allexivirus</i>	29
3. Produção das sondas não-radioativas vírus-específicas.....	31
4. Detecção de vírus de alho via Hibridização em “Dot Blot” com sondas não-radioativas.....	32
4.1. Metodologia de Hibridização em “Dot Blot” utilizando sondas não- radioativas.....	32
4.2. Limite de detecção das sondas não-radioativas marcadas com digoxigenina.....	33
4.3. Metodologias de extrações de extrato bruto e RNA total para detecção via Hibridização em “Dot Blot”.....	34
4.3.1. Extração de extrato bruto de tecidos foliares.....	34
4.3.2. Extração de RNA total de folhas sadias e infectadas.....	35
4.3.3. Detecção das amostras provenientes de extração a partir de extrato bruto e RNA total de folhas via Hibridização em “Dot Blot”.....	37
5. Detecção das espécies do complexo viral via RT-PCR.....	37

5.1. Extração do RNA total e Reação de Transcrição Reversa (RT).....	37
5.2. Reação de RT-PCR.....	38
5.3. Teste de verificação da qualidade do RNA total extraído e usado nas reações de RT-PCR	38
6. Detecção do complexo viral do alho por NCM-Elisa, Hibridização por “Dot Blot” e RT-PCR.....	39
6.1. Procedência e coleta das amostras.....	39
6.2. NCM-Elisa.....	41
6.3. Detecção por Hibridização em “Dot Blot” e RT-PCR.....	41
III) Resultados.....	43
1. Desenvolvimento de sondas moleculares espécie-específica e gênero-específico para vírus do complexo viral do alho.....	43
2. Sensibilidade das sondas não-radioativas desenvolvidas para a detecção dos vírus do complexo viral do alho.....	46
3. Detecção do complexo viral via RT-PCR.....	47
3.1. Especificidade da reação de PCR para amplificação de vírus do complexo do alho.....	47
3.2. Amplificação dos vírus do complexo do alho via RT-PCR a partir de extratos de RNA total de plantas.....	49
4. Comparação de métodos de detecção de espécies do complexo viral do alho via NCM-Elisa e RT-PCR.....	52
IV. Discussão.....	55

CAPÍTULO III: OCORRÊNCIA E PREVALÊNCIA DE ESPÉCIES VIRAIS NO COMPLEXO VIRAL DO ALHO (*Allium sativum*) EM REGIÕES PRODUTORAS DE ALHO NO BRASIL.....61

I. Introdução.....61

II. Material e Métodos.....65

1. Metodologia de detecção do complexo viral do alho nas amostras.....66

III. Resultados.....68

1. Ocorrência das espécies do complexo viral em quatro áreas produtoras de alho no Brasil.....68

2. Prevalência das espécies do complexo viral do alho por sistema produtivos e áreas produtoras de alho, no Brasil.....70

3. Prevalência das espécies do complexo viral do alho por cultivar.....74

IV. Discussão.....76

CAPÍTULO IV: EFEITOS FISIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E CITOLÓGICOS EM PLANTAS DE ALHO (*ALLIUM SATIVUM* L.) CAUSADOS POR INFECÇÃO VIRAL.....83

I. Introdução.....83

II. Material e Métodos.....86

1. Instalação do experimento.....86

2. Avaliação das variáveis de crescimento.....87

3. Avaliação das variáveis fisiológicas e bioquímicas.....88

3.1. Medidas fotossintéticas.....88

3.2. Pigmentos fotossintéticos.....89

3.3. Análise de açúcares solúveis totais (AST).....89

3.4. Extração e dosagem de amido.....91

3.5. Extração e quantificação de proteínas totais.....	92
3.6. Atividade da enzima Rubisco.....	93
4. Avaliação citológica das células infectadas pelo complexo viral.....	94
III. Resultados.....	96
1. Alterações nas variáveis de crescimento em plantas de alho sadias e infectadas pelo complexo viral.....	96
2. Alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas de alho sadias e infectadas pelo complexo viral.....	98
2.1. Variáveis fotossintéticas.....	98
2.2. Pigmentos fotossintéticos.....	100
2.3. Atividade da Rubisco.....	102
2.4. Proteínas totais.....	103
2.5. Açúcares solúveis totais.....	104
3. Alterações citológicas em plantas de alho sadias e infectadas pelo complexo viral.....	105
IV. Discussão.....	107
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118
ANEXO.....	134

ÍNDICE DE TABELAS

Tab.1. Evolução anual da produção mundial de alho (<i>Allium sativum</i>)...4.	4
Tab. 2: Ranking da produção nacional de alho, no ano de 2008.....5	5
Tab.3. Principais espécies de vírus encontradas associadas à cultura do alho, espécies tentativas e seu grupo vetor.....10	10
Tab. 4. Sequência dos oligonucleotídeos específicos (primers) sintetizados a partir da sequência da capa protéica de seis espécies virais que infectam alho nas principais regiões produtoras desta cultura do Brasil.....30	30
Tab. 5. Amostras de plantas de alho (<i>Allium sativum</i>) analisadas provenientes da Embrapa Hortaliças.....40	40
Tab. 6. Detecção do complexo viral do alho via NCM-Elisa com antissoros policlonais em amostras do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças.....53	53
Tab. 7. Detecção viral em amostras de alho provenientes do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças via RT-PCR com primers específicos para espécies do complexo viral do alho.....54	54
Tab. 8: Descrição das amostras de alho (<i>Allium sativum</i> L.) analisadas no Brasil, quanto à origem geográfica, o sistema produtivo e a cultivar.....67	67
Tab. 9. Prevalência das espécies do complexo viral do alho (<i>Allium sativum</i>) por sistema produtivo.....73	73
Tab. 10. Prevalência das espécies do complexo viral do alho (<i>Allium sativum</i>) por cultivar de alho comum e nobre por sistema de produção utilizados no Brasil.....75	75

Tab.11. Análise de variância para a variável área foliar.....	96
Tab. 12. Análise de variância para a variável altura.....	96
Tab. 13. Análise de variância para a variável massa fresca.....	96
Tab. 14. Análise de variância para a variável massa seca.....	97
Tab. 15. Análise de variância para a variável assimilação de CO ₂	98
Tab. 16. Análise de variância para a variável condutância estomática..	98
Tab. 17. Análise de variância para a variável evapotranspiração.....	99
Tab. 18. Análise de variância da variável clorofila <i>a</i>	100
Tab. 19. Análise de variância da variável clorofila <i>b</i>	100
Tab. 20. Análise de variância da variável carotenóides.....	156
Tab. 21 Análise de variância da variável proteínas totais.....	100
Tab. 22. Análise de variância da variável atividade da rubisco.....	102
Tab. 23. Análise de variância da variável açúcar solúvel tota aos 60 e 90 DAP, em cinco horários do dia, no ano de 2007.....	104.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig.1:** Evolução anual da produção nacional de alho (*Allium sativum*) nas principais regiões produtoras. Fonte: IBGE (2009).....4
- Fig. 2.** Representação esquemática do Vetor (pGem®-Teasy) contendo o segmento do gene da capa protéica de cada espécie viral. OYDV- *Onion yellow dwarf virus*; LYSV- *Leek yellow stripe virus*; GarCLV- *Garlic common latent virus*; GarV-C- *Garlic virus C*; GarV-D- *Garlic virus D* e GarMbFV- *Garlic mite-borne filamentous virus*.....29
- Fig. 3.** A: Produtos de PCR amplificados a partir do gene da capa protéica de cada espécie viral por um par de oligonucleotídeos específicos. B: Sondas não-radioativas, para a detecção dos vírus do complexo viral do alho, obtidas a partir da amplificação do gene da capa protéica de cada espécie viral por um par de oligonucleotídeos específicos e incorporação de (DIG-11-dUTP®).....44
- Fig. 4.** Sonda não-radioativa (fragmento de 317 pb) obtida a partir da amplificação do gene da capa protéica de OYDV, por um par de oligonucleotídeos específicos para o gênero *Potyvirus* via incorporação de Digoxigenin-11-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate, alkali-labile (DIG-11-dUTP®). M- 1kb DNA ladder; 1- *Onion yellow dwarf virus* (OYDV).....45
- Fig. 5.** Detecção de *Potyvirus* por Hibridização em “Dot Blot” com sondas moleculares não-radioativas gênero-específica para *Potyvirus*.....46
- Fig. 6.** Sensibilidade de seis sondas não radioativas marcadas com digoxigenina na detecção específica de espécies do complexo viral do alho via Hibridização em “Dot Blot”47

Fig. 7. Análise comparativa da visualização do produto de PCR em diluições seriadas via gel de agarose e sonda molecular não-radioativa.	49
Fig. 8. Avaliação da eficiência da extração de RNA total de plantas através da amplificação de um fragmento de 358 pb com um par de primers EF1F (5'-TGTTGCTGTTAAGGATTTGAAGCG-3') e EF1R (5'-AACAGTTTGACGCATGTCCCTAAC-3'), específicos para a porção interna de um gene conservado correspondente a um fator de elongação na maioria das plantas.	50
Fig. 9. Detecção do complexo viral do alho via RT-PCR com primers vírus-específicos em amostras de plantas provenientes das principais regiões produtoras do Brasil.	51
Fig. 10. Dispersão das espécies do complexo viral em áreas produtoras de alho no Brasil.	69
Fig. 11. Avaliação das variáveis de crescimento em plantas de alho (<i>Allium sativum</i>) sadias e infectadas pelo complexo viral em três épocas (30, 60 e 90 dias após o plantio) por três anos.	69
Fig. 12. Avaliação das variáveis fisiológicas em plantas de alho (<i>Allium sativum</i>) sadias e infectadas pelo complexo viral durante três anos.	97
Fig. 13. Avaliação da concentração de pigmentos fotossintéticos em plantas de alho (<i>Allium sativum</i>) livre de vírus e infectadas por um complexo viral durante três anos.	99
Fig. 14. Avaliação da atividade da Rubisco em plantas de alho (<i>Allium sativum</i>) sadias e infectadas por um complexo viral durante três anos.	102

Fig. 15. Avaliação da concentração de proteínas totais em plantas de alho (<i>Allium sativum</i>) sadias e infectadas por um complexo viral durante três anos.....	103
Fig. 16. Avaliação da concentração de açúcares solúveis totais em plantas de alho (<i>Allium sativum</i>) sadias e infectadas por um complexo viral no ano de 2007, aos 60 e 90 dias após o plantio.....	104
Fig. 17. Microscopia eletrônica de sessões ultra-finas do mesófilo de células de folhas de planta de alho (<i>Allium sativum</i>) sadias e infectadas por <i>Potyvirus</i> , <i>Carlavirus</i> e <i>Allexivirus</i> coletadas às 9:00h.....	106

RESUMO

A produção do alho em todo o mundo tem sido afetada por diversos patógenos, dentre eles destaca-se o complexo viral que infecta a cultura causando significativa redução na produção de alho no Brasil. Várias espécies foram identificadas no país, no entanto, os danos causados pelo complexo viral nas células e na fisiologia das plantas infectadas ainda é pouco estudado. São também escassas as informações sobre a ocorrência e prevalência desses patógenos nos diferentes sistemas produtivos de alho no país, estudo que demanda o desenvolvimento de um sistema de detecção viral específico e eficiente. Nesse contexto, o presente trabalho visou desenvolver e adaptar métodos de detecção específicos para as espécies virais do complexo do alho e determinar a ocorrência e prevalência desses patógenos nas regiões produtoras de alho no país. Também foram estudadas as principais alterações fisiológicas morfológicas, bioquímicas e citológicas causadas pelo complexo viral nas plantas infectadas, possibilitando a associação dessas informações com as perdas de produção causadas pela infecção viral. O Capítulo I apresenta uma revisão atualizada dos temas abordados no trabalho com o referencial teórico e as informações científicas disponíveis até o presente. O Capítulo II mostra o desenvolvimento de seis sondas não-radioativas espécie-específicas e uma gênero-específico confeccionadas para a detecção das espécies do complexo viral utilizando hibridização em "Dot-Blot" em membrana de nitrocelulose. Reações de PCR, utilizando primers específicos para as sequências da

CP de seis vírus detectados no país (*Potyvirus: Onion yellow dwarf virus- OYDV, Leek yellow stripe virus- LYSV; Allexivirus: Garlic virus C- GarV-C, Garlic virus D- GarV-D e Garlic mite-borne filamentous virus- GarMbFv e Carlavirus: Garlic common latent virus- GarCLV*), foram efetuadas para a síntese das sondas específicas marcadas com digoxigenina. Os resultados mostraram que as sondas foram específicas para a detecção do gene da capa protéica de cada espécie viral. Todas as sondas espécie-específicas foram sensíveis para detectar o cDNA do gene da capa protéica de suas respectivas espécies a uma concentração de 0,03 ng/ μ L. Entretanto, as mesmas não permitiram a detecção de amostras provenientes de RNA total. Foi demonstrado também, que a técnica de hibridização aumentou a capacidade de visualização dos produtos da PCR auxiliando na maior sensibilidade de detecção dos vírus. Paralelamente ao desenvolvimento das sondas, a técnica de RT-PCR foi desenvolvida para a detecção de amostras provenientes de RNA total, sendo estes resultados, comparados com a detecção sorológica via ELISA. Os resultados obtidos indicaram a maior sensibilidade da RT-PCR na detecção de diversas espécies virais em plantas matrizes provenientes de limpeza clonal, que supostamente deveriam estar livres de vírus.

No Capítulo III foi estudada a prevalência e a ocorrência das seis espécies virais em regiões produtoras de alho no Brasil sob diferentes sistemas produtivos. Para isso, amostras de alho foram coletadas nas regiões produtoras para análise via RT-PCR com primers específicos. Os resultados revelaram a ocorrência de *Potyvirus* (OYDV e LYSV) em todas

as regiões. O *Carlavirus* (GarCLV) ficou restrito as regiões de produção de Cerrado (MG, BA e GO). Em todas as regiões amostradas foi observada, no mínimo, uma espécie de *Allexivirus* (GarMbFV, GarV-C e GarV-D). A prevalência desses vírus nas regiões produtoras foi relacionada principalmente ao tipo de sistema produtivo e as variedades de alho utilizadas pelos produtores rurais. Foram realizadas avaliações em planta de alho sadias (PS), livres de vírus, e infectadas (PI), com um complexo viral com a finalidade de estudar os efeitos fisiológicos, morfológicos, bioquímicos e citológicos causados pelos vírus. Bulbilhos foram semeados em vasos e 30, 60, 90 dias após plantio (DAP) foram realizadas as avaliações de várias variáveis fisiológicas e bioquímicas durante 3 anos e comparadas estatisticamente. As plantas sadias apresentaram desenvolvimento superior em relação às plantas infectadas. A análise fotossintética revelou que as plantas sadias assimilaram 20% a mais de CO₂, do que as plantas infectadas, somente aos 30 DAP. Houve uma redução nos teores de clorofilas a e b, nas três épocas de avaliação, durante os três anos, mas não no teor de carotenóides, para as plantas infectadas. Não se observou diferença significativa na atividade da Rubisco, na produção de açúcares solúveis totais e proteínas totais. A avaliação de amido revelou que as plantas de alho não acumulam amido ou o fazem em baixas concentrações. Este resultado foi confirmado pelas análises citológicas em células de plantas sadias.

Além disso, foi observada a presença de aglomerações de compostos lipídicos fora dos cloroplastos normais das células sadias. Em contrapartida, os cloroplastos das células infectadas apresentaram

deformação estrutural, acúmulo de substâncias lipídicas, no interior dos mesmos e aumento de volume. Os estudos realizados permitiram desenvolver duas técnicas sensíveis e específicas para auxiliar na diagnose das espécies do complexo viral, determinar a distribuição das espécies do complexo viral prevalente nas regiões produtoras do Brasil em diferentes sistemas produtivos e auxiliar na compreensão das respostas das plantas de alho na ativação de processos metabólicos e possíveis mecanismos envolvidos na defesa contra infecções virais.

ABSTRACT

Garlic production worldwide is affected by several plant pathogens. Among them, viruses represent one of the main pathogens causing significant crop losses. Several virus species were identified infecting garlic in Brazil, however, the damages caused by the viral complex on the physiology of infected plant and on the host responses to virus infection is poorly understood. The occurrence and prevalence of these virus species in the different garlic-growing regions in Brazil is unknown. For this purpose an efficient and specific-detection method is necessary. Based on the lacking of information, this work aimed to develop a specific technique to detect the virus species infecting garlic, to determine the occurrence and prevalence of these species in the country. In addition, the main physiological, biochemical and cytological alterations caused by virus infection in diseased plants were investigated. The Chapter I present an up-to-date review and the state of the art on this topic. The Chapter II shows the development of six non-radioactive virus-specific probes and one potyvirus-specific probe to detect the virus complex by Dot-blot hybridization. PCR reactions using coat protein specific-primers to the viruses detect in Brazil (*Potyvirus: Onion yellow dwarf virus- OYDV, Leek yellow stripe virus- LYSV; Allexivirus: Garlic virus C- GarV-C, Garlic virus D- GarV-D and Garlic mite-borne filamentous virus- GarMbFV and Carlavirus: Garlic common latent virus- GarCLV*) were performed to obtain virus-specific Dig-labeled probes. The results showed that the probes were able to specifically detect the viruses (cDNA samples) at a concentration of 0,03 ng/ μ L.

However, this efficiency was limited to detect viruses out of total RNA extracts. The hybridization technique was also able to increase the detection capacity of PCR products by gel-hybridization. Simultaneously, the PCR technique was developed to detect samples of total RNA extracts and these results were compared to serological detection by ELISA. PCR was able to detect several viruses even in tissue culture samples, presumably representing virus-free plants. In Chapter III, the prevalence and occurrence of the six virus species in different garlic-growing areas in Brazil were determined. Garlic bulbs were collected in different producing areas and analyzed by RT-PCR with specific primers. The results revealed the occurrence of *Potyvirus* (OYDV e LYSV) in all regions. The carlavirus (GarCLV) was restricted to the Cerrado area (MG, BA and GO). In all regions sampled at least one *Allexivirus* species (GarMbFV, GarV-C and GarV-D) was detected. The virus prevalence in the different regions of Brazil was related with the growing system and garlic varieties employed by the growers. Healthy (HP) and infected (IP) garlic plants were studied in order to elucidate the main physiological, biochemical and cytological alterations caused by virus infection. Plants were analyzed at 30, 60 and 90 days after planting (DAP) and several physiological and biochemical characteristics were determined and compared. Healthy plants showed higher development than infected ones. The photosynthesis analyzes showed that healthy plants assimilated 20% more CO₂ than infected plants only at 30 DAP.

A reduction of chlorophylls a e b was observed in all evaluations but not in the carotenoid contents in infected plants. No significant differences were observed in the Rubisco activity, total soluble sugars and total proteins contents. The results also showed no or not detectable starch accumulation. These results were confirmed by cytological analyses in healthy plants. In addition, lipids accumulation was observed outside these normal chloroplasts. In contrast, chloroplasts of infected plants showed structural deformation, accumulation of lipids inside the organelle and structural swallow. Overall, the studies performed in this work allowed the development of two sensitive and specific techniques to detect the viruses belonging to the garlic virus complex. Using these techniques the occurrence and prevalence of the viruses infecting garlic in different region of Brazil was also determined. The studies of the physiological, biochemical and cytological alterations can help the understanding of processes and mechanisms involved on host responses to virus infection.

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL

1. A cultura do alho

O alho (*Allium sativum* L.) pertencente à família *Alliaceae*. É originário da Ásia Central e era utilizado pelos povos hindus, egípcios, gregos e por quase todas as antigas culturas do Velho Mundo. Sua introdução nas regiões ocidentais se deu por navegadores espanhóis, portugueses e franceses (Mota *et al.*, 2005). Segundo Menezes Sobrinho (1993 e 1997), é possível que o alho plantado no Brasil tenha vindo do México, do Egito e de alguns países da América do Sul. É uma planta herbácea com aproximadamente 50 cm de altura e que apresenta folhas lanceoladas, alongadas e estreitas. Reproduz-se de forma assexuada e sua propagação se dá através do plantio dos bulbilhos (ou dentes).

É uma hortaliça que possui alto valor nutricional, e em sua composição estão: vitaminas (A, B2, B6, C), aminoácidos, adenosina, sais minerais (ferro, silício, iodo), enzimas, como a aliniase, diretamente responsável pela quebra da alicina. A alicina é um óleo essencial volátil sulfuroso da classe dos terpenóides liberado quando as células do bulbilho de alho são rompidas. Esta substância, que tem o aroma marcante, tem potencial fitoterápico, pois atua na inibição da atividade de bactérias e fungos patogênicos à animais e vegetais (Yoshida *et al.*, 1987; Ress *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1997; Bianchi *et al.*, 1997; O’Gara *et al.*, 2000). Essas características tornam o alho, uma especiaria extremamente atrativa de ser incluída no cardápio diário, não somente pelo seu aroma e sabor, mas também pelos seus benefícios medicinais.

Atualmente, existem no mercado diversas cultivares que foram desenvolvidas para atender ao calendário de cultivo e à demanda do consumidor brasileiro. Essas cultivares se dividem em três grupos que se diferenciam pela duração do ciclo, exigências de fotoperíodo e de temperatura (Filgueira, 2000):

▶ Cultivares precoces ou comuns: o ciclo é de quatro meses, são cultivares menos exigentes em fotoperíodo e temperatura, apresentam larga adaptação ao cultivo em latitudes diferenciadas, porém apresentam bulbilhos pequenos e de menor valor comercial. Exemplos: cultivares Branco mineiro e Cateto roxo.

▶ Cultivares de ciclo mediano ou semi-nobre: o ciclo é de aproximadamente cinco meses, as cultivares são mais exigentes em fotoperíodo e temperatura. Produzem bulbilhos mais graúdos e alcançam melhor cotação comercial. Exemplos: cultivar Amaranite

▶ Cultivares nobres ou tardias: o ciclo é mais longo, em torno de seis meses, e são cultivares muito exigentes em fotoperíodo (mínimo de 13 horas) e em frio. Produzem bulbilhos graúdos de alta qualidade comercial, portanto obtém alta cotação comercial, o que torna as cultivares nobres competitivas ao alho importado. Exemplos: cultivares Chonan, Roxo-Pérola-de-Caçador e Quitéria. Devido às exigências climáticas, as cultivares nobres são plantadas na região Sul do país. Entretanto, a tecnologia de vernalização (choque frio – 4 °C por 45 a 60 dias), associada ao manejo adequado de irrigação, modifica a fisiologia da planta em relação ao fotoperíodo, induzindo a bulbificação precoce, o

que permite o plantio de alho nobre em latitudes menores, como o Cerrado (Silva *et al.*, 1985).

Para a escolha da cultivar a ser plantada em cada região, o agricultor não deve levar em conta apenas a produtividade, mas também a adaptação edafoclimática e, principalmente, a sanidade do material de propagação. Atualmente, na região Centro Oeste são cultivadas variedades nobres submetidas ao processo de vernalização e variedades de ciclo médio, sendo a implantação da cultura nos meses de fevereiro a abril. Na região sul, onde predomina o cultivo de variedades nobres, a concentração do plantio se dá nos meses de maio a junho. Na região nordeste há o predomínio das cultivares comuns.

2. Quadro da alhicultura no Brasil e no Mundo

A China lidera a produção mundial, com aproximadamente 75%, seguida da Índia (4%), Coreia (2%), Rússia (1,6%) e Estados Unidos (1,4%). O Brasil ocupa o 12º lugar na produção mundial e o 2º lugar na América do Sul, perdendo apenas para a Argentina (Tab. 1).

Tab.1. Evolução anual da produção mundial de alho (*Allium sativum*).

Ano	Produção mundial (mil t)	China	Índia	Coreia	Rússia	USA	Brasil	Argentina
		Participação %						
2001	11.468	68,8	4,3	3,5	2,0	2,3	0,9	1,2
2002	12.531	72,5	4,0	3,1	1,8	2,0	0,9	1,0
2003	13.629	74,0	3,3	2,8	1,6	2,1	0,9	1,1
2004	14.353	73,8	4,8	2,5	1,6	1,6	0,6	1,0
2005	14.868	74,5	4,3	2,5	1,7	1,5	0,6	0,8
2006	15.182	76,2	3,9	2,2	1,7	1,5	0,6	0,9
2007	15.800	76,4	4,1	2,2	1,6	1,4	0,6	0,9

Fonte: FAO-FAOSTAT (2009)

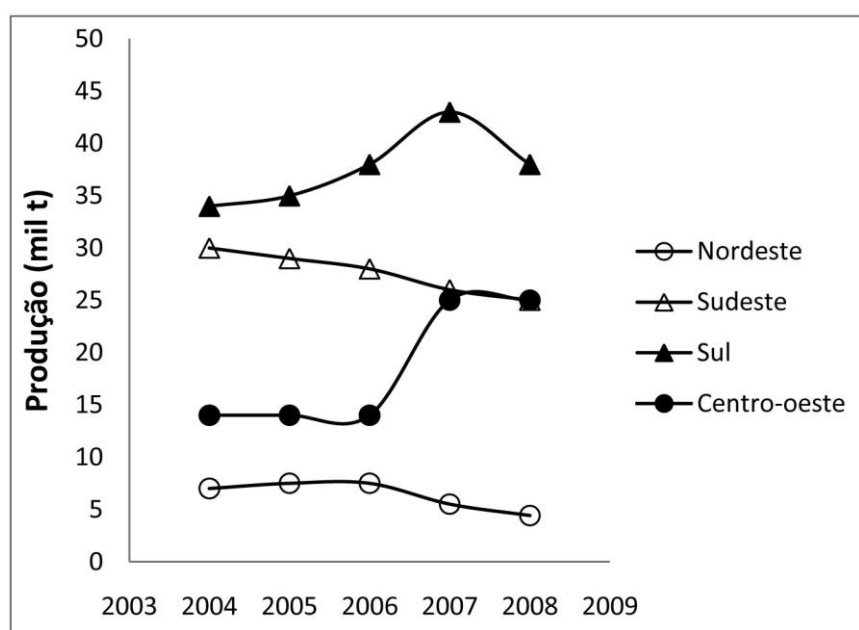


Fig.1: Evolução anual da produção nacional de alho (*Allium sativum*) nas principais regiões produtoras. Fonte: IBGE (2009).

Desde 2004, o cenário da produção nacional vem sofrendo alterações (Fig. 1). Na Tabela 2, é possível observar a produção nacional por Estado produtor, com destaque para Goiás, que encontra-se em primeiro lugar no ranking da produção nacional.

Ecogeograficamente, no bioma cerrado (Distrito Federal, Goiás, Bahia e Minas Gerais) se concentram mais de 50% da produção nacional de alho, especialmente o do grupo nobre, com uso da tecnologia de vernalização, suplantando as regiões de clima frio do sul do país (40%) (Tab. 1).

Tab. 2: Ranking da produção nacional de alho, no ano de 2008.

Ranking Nacional	Estado	Produção (mil t)	Participação (%)
1º	Goiás	23,3	25,4
2º	Minas Gerais	22,1	24,1
3º	Rio Grande do Sul	19,7	21,5
4º	Santa Catarina	14,2	15,5
5º	Bahia	4,3	4,7
6º	Paraná	3,7	4,1
7º	Distrito Federal	1,8	2,0
8º	São Paulo	1,7	1,9
9º	Espírito Santo	0,7	0,8

Fonte: IBGE (2009)

Em 2008, a produção nacional foi de 91.714 t, numa área de 10.228 ha rendendo ao país R\$ 216.827.000 (IBGE, 2009). Entretanto essa produção não foi suficiente para suprir a demanda interna de 215.000 t, ou seja, um déficit de aproximadamente 62%. Neste mesmo ano, o Brasil importou 145.811 t, batendo o recorde de importação, sendo

a China a origem de 58% da importação e a Argentina de 42%, o que corresponde a uma evasão de divisas da ordem de 200 bilhões de dólares anuais (Sistema AliceWeb, 2009).

Com a intenção de transformar o quadro atual da alhicultura no país, a Associação Nacional dos Produtores de Alho (ANAPA) vem se fortalecendo e representando ativamente a classe, através de ações junto ao Governo Federal e aos seus órgãos de classe, no intuito de solucionar os impasses de ordem comercial e a regulamentação de aspectos fitossanitários que são considerados graves para o setor.

Em julho de 2009 a Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SDA/Mapa) apresentou à ANAPA um projeto de lei para regulamentar a fiscalização da qualidade dos produtos agrícolas importados pelo Brasil, com ênfase em alho e maçã, uma conquista para a alhicultura nacional. Em contrapartida, a ANAPA, com o auxílio da Embrapa, propôs ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), em Julho de 2009, a regulamentação da produção e da comercialização de alho semente no Brasil, visando minimizar as perdas causadas por patógenos (www.anapa.com.br).

3. Problemas Fitossanitários

O agronegócio mundial movimentou, em 2002, em torno de U\$1,5 trilhão. Desse total, U\$ 500 bilhões foram perdidos para controlar pragas (Agrios, 2005). Assim, entende-se a preocupação mundial de se buscar tanto normas reguladoras de produção como um controle efetivo para os problemas fitossanitários.

O alho é acometido por inúmeros problemas fitossanitários causados, em sua maioria, por fungos. Porém, bactérias, nematóides e vírus têm papel fundamental no decréscimo da produtividade (Massola Junior *et al.*, 2005).

Dentre os principais agentes de etiologia fúngica que afetam a cultura do alho estão: a) Patógenos de solo: *Sclerotium cepivorum* Berk causador da podridão branca (Massola Junior *et al.*, 2005). Este fungo não produz esporos, mas produz escleródios, estruturas de resistência que possibilitam a sobrevivência do patógeno no solo ou em restos de cultura. Os escleródios mantêm-se viáveis por vários anos (7 a 10 anos) no solo, mesmo na ausência do hospedeiro. O *S. cepivorum* causa impactos severos na produção pela podridão do sistema radicular e dos bulbos dependendo do nível de infestação do solo ou infecção da semente, podendo chegar à perda total da lavoura; *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (Hans.) Snyder & Hans é causador da fusariose ou podridão seca do sistema radicular (Massola Junior *et al.*, 2005). b) Parte aérea: *Alternaria porri* (Ellis), causador da mancha púrpura nas folhas, é a segunda doença em importância, e está disseminada por todas as regiões produtoras, gerando perdas da ordem de 50 a 60% da produção (Menezes Sobrinho, 1993); *Puccinia allii* G. Wint, causador da ferrugem nas folhas, é uma das doenças mais comuns da cultura do alho e tem sua ação fortemente influenciada pela temperatura e estágio fenológico da cultura (Massola Junior *et al.*, 2005).

As principais doenças de etiologia bacteriana são (Massola Junior *et al.*, 2005): Podridão bacteriana causada por *Pectobacterium*

carotovorum subsp. *carotovorum* (Jones) Houben; Podridão bacteriana da escama, ocasionadas por *Burkholderia cepacia* (Palleroni & Holmes) Yabuichi; Queima bacteriana provocada por *Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens.

Quanto aos nematóides, destaca-se o *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) Filipjev, que causa a muchadeira ou o amarelão do alho e é uma das doenças mais severas para a cultura. Este patógeno pode sobreviver no solo ou em restos culturais por 8 a 10 anos (Stuhrn & Brzeski, 1991), mesmo na ausência do hospedeiro, devido a uma estratégia de sobrevivência chamada anidrobiose. O nematóide paralisa seus processos vitais por dormência ou desidratação temporariamente e retorna seus processos vitais em condições favoráveis, tornando esse patógeno de difícil controle e constituindo um grave problema para a cultura do alho. É um nematóide de bulbos, sendo os bulbilhos-semente importantes agentes de disseminação deste patógeno, juntamente com as inúmeras hospedeiras intermediárias (Tenente *et al.*, 2000).

O controle dos patógenos de solo como *S. cepivorum* e *D. dipsaci* deve ser realizado de forma preventiva, principalmente através da utilização de sementes com alta qualidade sanitária e rotação de culturas. A adoção de medidas quarentenárias é a única alternativa para evitar a entrada destes patógenos em áreas livres. O controle químico na maioria dos casos é pouco eficiente e muito dispendioso.

4. Principais vírus que infectam a cultura do alho no Brasil e no mundo

4.1. Complexo viral do alho

As plantas de alho quando apresentam sintomas de leves necroses a mosaicos estriados nas folhas podem estar infectadas por diferentes espécies de vírus, isoladamente ou em associação constituindo um complexo viral. A forma de propagação vegetativa, através dos bulbilhos, facilita o acúmulo e a perpetuação dos vírus, sendo um grave problema para a cultura isto culmina com reduções da área foliar, do porte das plantas e do massa dos bulbos, levando a uma redução no vigor vegetativo (Resende *et al.*, 1995).

Os vírus de alho estão disseminados por todo o mundo e encontram-se distribuídos em três gêneros: *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus* (Fajardo *et al.*, 2001; Conci *et al.*, 2002; Shibolet *et al.* 2001; Koo *et al.*, 2002; Melo Filho *et al.*, 2006; Takaki *et al.*, 2005; Dovas *et al.*, 2001). A Tab. 3 apresenta um resumo das espécies já caracterizadas no mundo e seus grupos de vetores.

Tab.3. Principais espécies de vírus encontradas associadas à cultura do alho no mundo, espécies tentativas e seu grupo vetor.

Espécies	Acrônimo	Família	Gênero	Vetor
<i>Leek yellow stripe virus</i>	LYSV	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	afídeos
<i>Onion yellow dwarf virus</i>	OYDV	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	afídeos
<i>Garlic common latent virus</i>	GarCLV	<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Carlavirus</i>	afídeos
<i>Shallot latent virus</i>	SLV	<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Carlavirus</i>	afídeos
<i>Garlic mite-borne filamentous virus</i>	GarMbFV	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Garlic virus A</i>	GarV- A	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Garlic virus B</i>	GarV- B	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Garlic virus C</i>	GarV- C	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Garlic virus D</i>	GarV- D	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Garlic virus E</i>	GarV- E	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Garlic virus X</i>	GarV- X	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Shallot virus X</i>	ShV- X	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Onion mite-borne latent virus</i>	OMbLV	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Shallot mite-borne latent virus</i>	ShMbLV	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Garlic mosaic virus</i>	GarMV	<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Carlavirus</i>	afídeos

Fonte: ICTVdb (2010) & Plant Viruses Sequences (2010)

4.2. Potyvirus

A família *Potyviridae* constitui o maior e mais importante grupo de vírus de plantas do ponto de vista econômico (Zerbini & Zambolim, 2000), sendo que aproximadamente 20% dos vírus de plantas já caracterizados pertencem a essa família. De acordo com o ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) em 2010, esta família contém 196 espécies distribuídas em seis gêneros (*Potyvirus*, *Bymovirus*, *Rymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus* e *Tritimovirus*) Além disso, existem 159 espécies tentativas. O gênero *Potyvirus* é o principal representante desta família, com 146 espécies.

Os *Potyvirus* são transmitidos por vetores ou mecanicamente. Entretanto, a transmissão mais eficiente se dá por meio de afídeos, em uma relação de transmissão do tipo não persistente (Costa, 1998); por esse motivo os *Potyvirus* são cosmopolitas, sendo amplamente

distribuídos no mundo inteiro. Infectam mais de 2.000 espécies de plantas de mais de 550 gêneros e 81 famílias. Coletivamente, os *Potyvirus* causam perdas superiores às causadas por todos os outros vírus de plantas em conjunto (Zerbini & Zambolim, 1999).

As espécies desse gênero possuem partícula alongada, filamentosa e flexuosa medindo de 690 a 820 nm de comprimento com 11 a 16 nm de diâmetro. Possuem RNA de fita simples e cauda de poli A na região 3', senso positivo são envoltos por uma capa protéica composta de subunidades de uma proteína com massa molecular variando de 30 a 37 KDa (Martelli, 1997) e genoma com 8 a 12 Kb (Virus Taxonomy).

A cultura do alho é infectada por duas espécies de *Potyvirus*, o LYSV e OYDV, que são considerados os mais importantes vírus para a cultura. Estão amplamente distribuídos nas regiões produtoras de alho do mundo, inclusive no Brasil (Takaichi *et al.*, 1998; Koo *et al.*, 2002; Conci *et al.*, 2002; Dovas *et al.*, 2001; Fajardo *et al.*, 2001). Causam reduções no massa e no perímetro de bulbos, que se acentuam quando infectam associados a outras espécies virais (Takaichi *et al.*, 2001).

4.3. *Allexivirus*

O gênero *Allexivirus* encontra-se alocado na família *Alphaflexiviridae*. Este gênero possui oito espécies de vírus e mais duas espécies tentativas (Tab. 3). As espécies deste gênero possuem uma partícula filamentosa e flexuosa, de aproximadamente 800 nm de comprimento e 12 nm de diâmetro, têm simetria helicoidal, seu genoma é de RNA de fita simples de 9,0 Kb e se encontra envolto por uma proteína capsidial de 28 KDa. Seus hospedeiros naturais são restritos às espécies

do gênero *Allium*. São transmitidos por ácaros e persistem no material propagativo do hospedeiro. Podem ser transmitidos mecanicamente para *Allium* spp., e, em alguns casos, para *Chenopodium murale* (Adams *et al.*, 2004).

Assim como os *Potyvirus*, os *Allexivirus* encontram-se amplamente distribuídos em todo o mundo. Em alguns países, como a Coreia, os *Allexivirus* foram identificados como os mais abundantes dentre os vírus do complexo viral do alho, por estarem amplamente distribuídos em todas as regiões produtoras do país (Koo *et al.*, 2002). De acordo com ICTV (2009), oito espécies foram caracterizadas e estão em análise mais três espécies tentativas (Tabela 3). No Brasil, foram detectadas três espécies (Melo Filho *et al.*, 2006): GarMbFV, GarV-C e GarV-D. Os *Allexivirus* influenciam negativamente a produção de alho quando infectam em combinações com *Potyvirus* (Takaichi *et al.*, 2001d). Entretanto, há falta de informação dos efeitos causados pela infecção, devido à dificuldade de isolar cada espécie do complexo viral e a falta de antissoros espécie-específicos para a detecção (Cafrune *et al.*, 2006).

4.4. Carlavirus

O gênero *Carlavirus*, está alocado na família *Betaflexiviridae*. As espécies deste gênero apresentam partículas com 610 a 700 nm de comprimento e de 12 a 15 nm em diâmetro com simetria helicoidal. O genoma de RNA de fita simples, com 7,4 a 7,9 Kb, codifica seis cadeias abertas de leitura (ORFs) e está envolto por uma capa protéica de 31 a 36 KDa. A maioria das espécies é transmitida por afídeos, com uma relação de transmissão do tipo não persistente, e podem também ser transmitidos

mecanicamente, por mosca-branca ou via semente. Algumas espécies são restritas geograficamente. Porém, em hospedeiras que podem ser propagadas vegetativamente, estas espécies estão amplamente distribuídas.

Em todo o mundo, foram detectadas duas espécies de *Carlavirus* (Tab. 3) e uma espécie tentativa (Garlic mosaic virus- GarMV) (Adams *et al.*, 2004) infectando a cultura do alho. No Brasil, até final de meados de 2009, apenas o *Garlic common latent vírus* havia sido detectado (Fajardo *et al.*, 2001). Em um estudo recente o *Shallot latent virus* foi também detectado (Mituti, 2009).

Apesar de apresentarem uma distribuição cosmopolita, os *Carlavirus* que infectam a cultura do alho não são endêmicos. Isoladamente, estes vírus são considerados de pouca importância econômica. Em alho porró (*Allium porrum*) há registro de que, em combinação com o OYDV e o LYSV, pode reduzir ainda mais a produção (Paludan, 1980 citado por Dovas *et al.*, 2001).

5. Efeitos causados pela infecção viral

5.1. Desenvolvimento de sintomas

Os vírus são inoculados na célula da hospedeira, em sua maioria, por meio de um vetor de transmissão. Após sua penetração, o vírus perde sua capa protéica liberando o material genético no interior da célula. Se houver compatibilidade, inicia-se o processo de replicação do material genético e a síntese de proteína capsidial e outras. O vírus passa a comprometer integridade dos processos celulares em todos os níveis. A

princípio ocorrem modificações fisiológicas e bioquímicas pela ativação ou bloqueio de determinadas atividades celulares.

Em seguida, ocorre o aparecimento de sintomas macroscópicos de mosaico, que refletem as mudanças histológicas nas plantas, acarretando hipoplasia nas áreas amareladas, resultando em menor diferenciação das células do mesófilo com conseqüente diminuição no número de cloroplastos e espaços intercelulares (Hull, 2002).

5.2. Efeitos Citológicos (nos componentes celulares)

Alguns vírus formam inclusões citoplasmáticas e este acúmulo de proteínas na célula do hospedeiro pode afetar diretamente os componentes celulares, como nucléolo, núcleo, citoplasma e suas organelas (El-Ela *et al.*, 2006; Zechmann *et al.*, 2003; Hull, 2002). Os *Potyvirus* são um exemplo característico de vírus que formam inclusões cristalinas no citoplasma das plantas infectadas (Hull, 2002) e, em alguns casos, estão associadas ao aparecimento de vesículas nas células infectadas (Musetti *et al.*, 2002).

As organelas sofrem alterações visíveis em células infectadas. As mitocôndrias podem apresentar anormalidades em sua forma (Di Franco *et al.*, 1984; El-Ela *et al.*, 2006), no desenvolvimento das membranas internas (Francki, 1987 citado por Hull, 2002), em sua distribuição no citoplasma (Kitajima & Lovisolo, 1972). De maneira geral, os cloroplastos apresentam mudanças em estrutura, número, quantidade e tamanho de grãos de amido, além da desorganização interna da organela (El-Ela *et al.*, 2006; Hull, 2002; Zechmann *et al.*, 2003).

A parede celular pode apresentar anormalidades na espessura, protruções, deposição de calose e de material eletro-denso (Hull, 2002).

5.3. Efeitos Fisiológicos e Bioquímicos

A infecção viral altera os processos fisiológicos e bioquímicos vitais da planta como o acúmulo de nutrientes em órgãos de armazenamento, o desenvolvimento de tecidos jovens, a absorção e o transporte de água e de elementos minerais através do sistema vascular, a fotossíntese e a utilização, pela planta, das substâncias elaboradas através da fotossíntese (Taiz & Zaiger, 2006).

Em vários estudos, em diferentes patossistemas, foram identificadas inúmeras alterações decorrentes da infecção viral na fotossíntese, dentre elas uma redução na taxa fotossintética (Arias *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2005; Sampol *et al.*, 2003; Rowland *et al.*, 2005), na atividade da rubisco (Sampol *et al.*, 2003), na condutância estomática (Bertamini *et al.*, 2004), na quantidade de pigmentos, de carboidratos e de proteínas (Radwan *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2005; Bertamini, *et al.*, 2004; Jadão *et al.*, 2004; Sampol *et al.*, 2003; Shalitim & Wolf, 2000; Rahoutei *et al.*, 2000). Verifica-se também aumento na quantidade de açúcares solúveis totais e de amido (Gonçalves *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2003; Musetti *et al.*, 2002; Shalitim & Wolf, 2000) e uma queda na eficiência da cadeia de transporte de elétrons (Reinero & Beachy, 1989). De acordo com esses estudos essas alterações podem refletir diretamente no crescimento e desenvolvimento das plantas, afetando a produtividade e qualidade dos produtos.

5.4. Injúrias, danos e perdas

De acordo com Zadoks (1985) **injúria** é qualquer sintoma prejudicial visível ou mensurável causado pelo organismo patogênico; **dano** é a redução na quantidade ou qualidade da produção; e **perda** é uma redução financeira por unidade de área devido ao organismo prejudicial, condicionada às condições de mercado. Assim, nem toda injúria se concretiza em dano, mas todo dano é decorrente de uma injúria. De modo semelhante, nem todo dano se concretiza em perda, mas toda perda é decorrente de um dano. Essas são as definições que serão utilizadas neste trabalho.

Os reflexos das alterações fisiológicas, morfológicas, bioquímicas e citológicas pela infecção viral estão diretamente ligados a danos na produção de alho (Lot *et al.*, 1998; Tanabe, 1999; Conci *et al.*, 2003; Melo Filho *et al.*, 2006).

Os maiores danos na produção em alho têm sido atribuídas às infecções causadas por OYDV e LYSV. Esses vírus podem, isoladamente, provocam a redução na massa de bulbos de 39 a 60% e de 17 a 54%, respectivamente, dependendo da cultivar (Lot *et al.*, 1998). A infecção simultânea pode acentuar os danos devido ao efeito sinérgico entre os diferentes vírus do complexo viral que infecta o alho, principalmente pela presença de OYDV e LYSV.

De acordo com Lunello *et al.* (2007) as plantas livres de vírus ou infectadas somente com LYSV apresentaram massa, perímetro de bulbos e emergência das plantas duas vezes maior do que as plantas infectadas pelo complexo viral (OYDV, LYSV e GarV-A), revelando o impacto da

reinfecção em campo e o efeito de LYSV como um componente do complexo viral do alho.

A infecção de plantas de alho cv. Blanco-IFFIVE por dois *Allexivirus* (GarV-A e GarV-C) foi analisada isoladamente por dois anos consecutivos. Foram registradas reduções em massa de bulbos de 32 e 14% e de 15% e 9%, respectivamente, em relação às plantas livres de vírus. Já as plantas infectadas com o complexo viral composto por, OYDV, LYSV, GarV-A, GarV-C, GarV-D e GarCLV apresentaram redução de até 61% na massa de bulbos em relação às plantas sadias (Cafrune *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram obtidos por Canavelli *et al.* (1998) que verificaram uma redução de 60 e 53% na massa de bulbos de duas cultivares, em plantas infectadas pelo complexo (OYDV, LYSV e GarMbFV) quando comparadas às plantas livres de vírus.

Analisando plantios de alho livre de vírus durante três anos consecutivos, Tanabe (1999) verificou, ao final do terceiro ano, que 47% das plantas originalmente livres de vírus estavam infectadas e apresentaram uma queda de 27% na produção. Entretanto, essa queda foi irrelevante quando comparada as plantas provenientes de sementes utilizadas pelo produtor. Ao final dos três anos de exposição em campo as plantas de alho-semente livre de vírus apresentaram um aumento de produção de 100%, quando comparadas às plantas originadas de alho-semente utilizado pelo alhicultor. Semelhantemente, um aumento de 66 a 216% na massa de bulbos de plantas livres de vírus em relação às plantas infectadas foi obtido no primeiro ciclo utilizando-se o mesmo

material de cultivo em experimento na Argentina e, ainda no quinto ciclo, foi observado aumento de 33% (Conci *et al.*, 2003).

No Brasil, em estudo conduzido por sete anos consecutivos, verificou-se as características de degenerescência relacionadas à reinfecção no cultivo de alho, registrando um aumento de 141% da produção em plantas livres de vírus em relação às infectadas pelo complexo viral no primeiro ciclo, enquanto que, no quinto ciclo, ainda foi registrado um aumento de 49%. Em condições experimentais com alta pressão de inóculo, até na sétima geração de plantio, a produção foi cerca de 30% maior que aquela obtida com o alho utilizado comumente pelo produtor (Melo-Filho *et al.*, 2006).

6. Métodos de detecção do complexo viral

As viroses são difíceis de serem evitadas devido à transmissão via vetores ou pela eficiente transmissão via bulbilhos-semente contaminados. O alho livre de vírus possui uma produção até 118% maior que a do alho utilizado pelo produtor rural, normalmente infectado pelo complexo viral (Melo-Filho *et al.*, 2006). Entretanto, produzir bulbilhos-semente livres de vírus demanda tempo e recursos financeiros. Dentro de um programa de produção de alho livre de vírus, a etapa de indexação deve ser eficiente, visando uma detecção rápida, sensível e específica.

Existem hoje várias técnicas que podem ser utilizadas para dar suporte a um programa de indexação de alho, incluindo microscopia eletrônica, hibridização de ácidos nucleicos, Elisa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) e RT-PCR (Transcriptase Reverse – Polymerase Chain Reaction), sendo as duas últimas as mais comumente usadas

(Martim *et al.*, 2000).

A ISEM (ImmunoSorbent Electron Microscopy) foi usada na indexação de alho devido a sua alta acurácia (Walkey Antill, 1989; Conci & Nome, 1991), porém, o alto custo e o baixo rendimento são sérias limitações para o uso contínuo desta técnica.

O Elisa é o principal método diagnóstico utilizado para teste de rotina em larga escala na detecção de vírus infectando alho (Lunello *et al.*, 2007; Melo-Filho *et al.*, 2006; Cafrune *et al.*, 2006; Conci *et al.*, 2002; Dovas *et al.*, 2001; Lot *et al.*, 1998). Entretanto, a produção de antissoros específicos contra os vírus de alho é dificultada devido ao entrave de se isolar as espécies do complexo, além da falta de hospedeiras alternativas para as diferentes espécies (van Dijk, 1993). Outro ponto a se considerar é maior variabilidade da região N-terminal da capa protéica dos *Potyvirus* e *Allexivirus* (Tsuneyoshi *et al.*, 1998b; Lu *et al.*, 2008), apresentando epitopos específicos, resultando na ocorrência de isolados sorologicamente distintos. Assim, pode ocorrer dificuldade na produção de um antissoro espécie específico que seja capaz de detectar toda a variabilidade existente (Dovas *et al.*, 2001).

A técnica de RT-PCR vem ganhando espaço na detecção das espécies do complexo viral do alho, pois é altamente específica e sensível (Lunello *et al.*, 2005; Koo *et al.*, 2002; Shibolet *et al.*, 2001; Takaichi *et al.*, 1998). Uma grande vantagem desta técnica é a detecção de vírus a partir de uma pequena quantidade do RNA alvo.

A hibridização de ácido nucléico com sondas não-radioativas por “Dot-Blot” é uma técnica amplamente utilizada para detecção de vírus em

plantas (Hull, 2002). Sanchez-Navarro *et al.* (1998) compararam três métodos para a detecção de *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) em *Prunus* sp. e verificaram que o Dot-blot foi 25 vezes mais sensível que o ELISA, porém 625 vezes menos sensível que a RT-PCR. Comumente, o Dot-blot não é utilizado para a detecção do complexo viral do alho no Brasil. Entretanto, Melo-Filho (2003) utilizou o Dot-blot para a detecção de GarMbFV, GarV-C e GarV-D e obteve resultados positivos somente na detecção do controle positivo (gene da capa protéica de cada espécie clonada em pGEM-T) na concentração de 10 ng. Porém, na detecção em extrato bruto de plantas infectadas, os resultados foram negativos. O autor sugeriu a continuidade do desenvolvimento do método com uma adequada preparação do extrato bruto.

É possível aliar as técnicas de detecção de acordo com a necessidade, com a disponibilidade de reagentes (antissoros, primers), de equipamentos (termociclador, microscópio eletrônico de transmissão) e de recursos financeiros.

7. Objetivos gerais

Desde 1992, a Embrapa Hortaliças desenvolve junto com a Universidade de Brasília e outros colaboradores pesquisas que permitam embasar um sistema de produção de alho semente livre de vírus. Dentro do programa está o desenvolvimento de um protocolo de indexação de alho em larga escala.

A técnica de ISEM, inicialmente utilizada, foi substituída pelo NCM-ELISA (NitroCelulose Membrane- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) utilizando um antissoro policlonal contra OYDV e um policlonal polivalente

(Embrapa Hortaliças) contra o complexo viral, produzidos no Brasil; e um antissoro contra LYSV produzido na Argentina. Por este método, as plantas obtidas a partir de cultura de meristemas são avaliadas por três ciclos de cultivos sequenciais, no intuito de evitar escape, dada a possibilidade de ocorrência de baixo título viral nas plantas oriundas de cultura de tecidos, abaixo do limite de detecção do método. A preocupação de minimizar o tempo no processo de indexação demanda o desenvolvimento de uma técnica mais sensível e capaz de detectar o material em larga-escala.

A reinfecção das plantas de alho livre de vírus pelo complexo viral quando liberado em campo de produção ocorre já no primeiro ciclo e, nos ciclos subsequentes, a reinfecção volta a atingir taxas de até 100% (Tanabe, 1998; Fajardo, 1999; Melo-Filho *et al.*, 2006). No Brasil, todos os campos de produção encontram-se infectados, mas não existem informações sobre distribuição das espécies virais nas regiões produtoras do país. Como o diagnóstico por NCM-ELISA não permite a detecção específica de todas as seis espécies que estão disseminadas no país, dada a ausência de antissoros específicos, faz-se necessário o desenvolvimento de um método de diagnose adequado para a realização de um levantamento detalhado da disseminação das espécies virais. Esta informação permitirá o estabelecimento de estratégias de controle e manejo mais adequadas quando associadas à distribuição de alho semente livre de vírus.

Os efeitos causados pelas infecções virais são bem estudados em vários patossistemas, mas focados em danos e perdas. As injúrias são

parcialmente estudadas, não havendo informações sobre os efeitos fisiológicos, citológicos e bioquímicos que uma infecção viral pode causar nas plantas de alho. Elucidar esses efeitos permitirá a compreensão da relação patógeno-hospedeiro.

Diante das necessidades abordadas o presente trabalho teve como objetivos:

- a) Desenvolver um sistema eficiente de indexação viral, utilizando duas metodologias sensíveis e específicas para a detecção em plantas de alho:
 - a.1) sondas espécie específicas para OYDV, LYSV, GARCLV, GarV-C, GarV-D e GarMbFV, e gênero-específica para *Potyvirus* ;
 - a.2) RT-PCR utilizando primers espécie específicos, baseados na comparação da sequência de nucleotídeos do gene da capa protéica destas seis espécies virais.
- b) Realizar um levantamento, para determinar a prevalência de espécies virais do complexo do alho nas principais áreas produtoras no Brasil, utilizando-se o RT-PCR como ferramenta de diagnose.
- c) Avaliar as alterações fisiológicas, morfológicas, bioquímicas e citológicas em plantas de alho causadas por infecção viral.

CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS PARA DIAGNOSE DE VÍRUS EM ALHO (*Allium sativum* L.)

I. INTRODUÇÃO

O alho é a quinta hortaliça em importância econômica no Brasil (IBGE, 2009). É acometido por várias doenças, sendo que os problemas fitossanitários são um entrave para a sua produção. O complexo viral que afeta a cultura no Brasil é composto por várias espécies de vírus (Fajardo *et al.*, 2001; Melo Filho *et al.*, 2004; Mituti, 2009). A infecção viral causa sintomas foliares que variam de mosaicos leves a estrias amareladas. Entretanto, como não induz à morte das plantas, a doença passa despercebida pelos agricultores, o que representa um grande problema para o cultivo, pois a infecção conduz à queda de até 60% na produção de bulbos (Lot *et al.*, 1998). Além disso, como o alho é propagado vegetativamente, há um acúmulo de vírus de um ciclo de produção ao outro, via material de propagação infectado.

Uma das formas para se evitar os danos causados pela infecção viral é a produção de plantas saudáveis sob condições controladas. Por essa razão, um programa de alho semente livre de vírus vem sendo desenvolvido pela Embrapa Hortaliças desde 1992, em estreita colaboração com a Universidade de Brasília, a fim de produzir plantas saudáveis através da cultura de ápices caulinares e da multiplicação do material propagativo em condições que previnam reinfecções. Para tal o estabelecimento de um sistema eficiente de indexação viral do material propagativo de alho proveniente de cultura de tecidos é fundamental.

Desde o início do programa, vários avanços foram alcançados. Foram produzidas plantas de alho livres de vírus (Torres *et al.*, 2000); foram caracterizadas seis espécies de vírus no Brasil (Fajardo *et al.*, 2001; Melo Filho *et al.*, 2004), foram geradas informações epidemiológicas determinando-se o impacto dos vírus no sistema produtivo (Melo Filho *et al.*, 2006); foram produzidos um antissoro polivalente contra o complexo viral do alho (principalmente os gêneros *Potyvirus* e *Carlavirus*) (Tanabe, 1999) e um antissoro policlonal específico contra o *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) (André Nepomuceno Dusi – Dados não publicados). Destacam-se ainda, os estudos que vêm sendo conduzidos na Universidade de Brasília, visando à expressão heteróloga *in vitro* do gene da capa protéica de vírus componentes do complexo viral do alho em um sistema de expressão em baculovírus. Até o momento, o projeto em andamento propiciou à produção de um antissoro contra o *Garlic virus C* (GarV-C) (Alves- Júnior *et al.*, 2008). Os esforços visando à caracterização dos principais vírus do complexo do alho no país resultaram na caracterização molecular de duas espécies de *Potyvirus*, o OYDV e o *Leek yellow stripe virus* (LYSV); de duas espécies de *Carlavirus*, o *Garlic common latent virus* (GarCLV) (Fajardo *et al.*, 2001) e Outro com referÊncia; e três espécies de *Allexivirus*, o *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV), o GarV-C e o *Garlic virus D* (GarV-D) (Melo-Filho *et al.*, 2006).

Na etapa inicial do programa de produção de alho-semente sadio, a técnica de ISEM (ImmunoSorbent Electron Microscopy) foi utilizada para a indexação das plantas oriundas de cultura de ápices caulinares. Porém,

é um método extremamente laborioso e que dificilmente, permite a avaliação de mais de 15 amostras por dia. O atual sistema de detecção consiste no uso do do NCM-Elisa (NitroCelulose Membrane- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) utilizando três antissoros policlonais disponíveis (contra o OYDV, contra o LYSV e um polivalente contra o complexo viral). Esse sistema é mais rápido do que o ISEM, principalmente, permitindo o manuseio de amostras em larga escala. No entanto, tem desvantagens, tais como: a dificuldade de produção de antissoros específicos devido às dificuldades de isolamento biológico das espécies do complexo viral (van Dijk, 1993); a presença de epitopos conservados na proteína capsidial das espécies de *Potyvirus* (Tsuneyoshi *et al.*, 1998b) e *Allexivirus* (Lu *et al.*, 2008) o que pode resultar em reações cruzadas durante o teste sorológico e comprometer a especificidade do método; a limitada sensibilidade da técnica que, na maioria das vezes, não é suficiente para detectar os vírus em plantas *in vitro* provenientes do processo de limpeza clonal. Essa dificuldade é resultante, geralmente, das baixas concentrações virais verificadas nesses materiais propagativos.

O uso da técnica de hibridização de ácidos nucleicos com sondas não-radioativas via “Dot Blot” vem sendo ampliado para a detecção de vírus em planta (Hull, 2002). Ela pode ser mais sensível e específica que o Elisa, podendo também ser realizada em larga escala na indexação de amostras vegetais. Comparando-se o Elisa com a Hibridização em “Dot Blot”, Sanchez-Navarro *et al.* (1998) verificaram que o “Dot Blot” foi 25 vezes mais sensível que o Elisa na detecção do *Prunus necrotic ringspot*

virus (PNRV). O “Dot Blot” e a RT-PCR foram utilizados com eficiência para testar plantas de alho provenientes de cultura de meristemas, para a presença de *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus*, entretanto, como esperado, a RT-PCR apresentou uma sensibilidade significativamente superior ao “Dot Blot” (Shiboleth *et al.*, 2001). No Brasil, a técnica de “Dot-Blot” foi testada para a detecção de três *Allexivirus*. O resultado foi positivo somente para a detecção do controle positivo (cDNA do gene da capa protéica de cada espécie clonada no vetor plasmidial pGEM-T) na concentração de até 10 ng. Porém, para a detecção viral em extrato bruto de plantas infectadas, não se obteve resultados satisfatórios (Melo Filho, 2003). O autor sugeriu a necessidade de adequação do método para a detecção mais eficiente a partir do extrato bruto de plantas infectadas.

Além da hibridização, a técnica de RT-PCR como método de detecção das espécies do complexo viral do alho pode ser viável, por ser altamente específica e sensível (Takaichi *et al.*, 1998; Shiboleth *et al.*, 2001; Koo *et al.*, 2002; Lunello *et al.*, 2005). Uma grande vantagem da técnica é a capacidade de detecção de vírus a partir de uma pequena quantidade do RNA alvo presente nas amostras. Porém, o desafio é otimizá-la para uso em larga escala tornando seu uso mais econômico.

Levando em consideração a necessidade de se desenvolver um sistema eficiente de indexação de alho-semente livre de vírus, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e comparar ferramentas de diagnose sensíveis e específicas para a detecção dos vírus que fazem parte do complexo viral do alho. Para tanto, as seguintes etapas de pesquisa foram propostas:

- a) Produzir sondas não-radioativas, espécie-específicas para os vírus do complexo viral do alho pertencentes aos gêneros *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus*;
- b) Produzir uma sonda gênero-específica para *Potyvirus*
- c) Testar diferentes metodologias de preparação de extrato bruto e de extração de RNA total a partir de tecidos de plantas infectadas para a detecção do complexo viral via Hibridização em “Dot Blot” com sondas não-radioativas;
- d) Desenvolver e otimizar a metodologia de RT-PCR para detecção específica das seis espécies do complexo viral do alho caracterizadas no Brasil, e;
- e) Realizar um estudo comparativo entre as técnicas de detecção de vírus por meio de NCM-Elisa, Hibridização em “Dot Blot” e de RT-PCR em plantas de alho provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Recuperação e Manutenção dos clones contendo os genes virais

As bactérias contendo os clones dos genes da capa protéica de seis vírus do complexo do alho (pGEM-T[®]Easy + CP OYDV, pGEM-T[®]Easy + CP LYSV, pGEM-T[®]Easy + CP GarCLV, pGEM-T[®]Easy + CP GarV-C, pGEM-T[®]Easy + CP GarV-D e pGEM-T[®]Easy + CP GarMbFV) (Fajardo *et al.*, 2001; Melo Filho *et al.*, 2003) (Fig. 2) e preservadas em freezer -80°C, na Universidade de Brasília, foram plaqueadas em meio L-Broth (LB) (Tryptona 10g/L; Extrato de levedura 5g/L; NaCl 10g/L e H₂O destilada) + ampicilina (0,1 µg/ µL) e incubadas sob agitação a 37°C por 14h. As colônias selecionadas foram re-cultivadas em meio LB líquido + ampicilina. Em seguida, a extração do DNA plasmidial em larga escala foi realizada de acordo com o protocolo de lise alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989), obtendo-se uma alíquota de 500 µl de DNA plasmidial recombinante contendo o gene da capa protéica de cada espécie viral mencionada acima. Deste volume aplicou-se 1 µL de cada DNA plasmidial, em gel de agarose (0,8%) preparados em tampão 0,5 x Tris-Borato-EDTA (TBE), o qual foi submetido à eletroforese a 120V, corado com brometo de etídio a 0,1mg/mL e visualizado sob luz ultravioleta no aparelho Alpha Innotech[®]. A concentração de cada solução de DNA plasmidial foi ajustada realizando-se as diluições das amostras, de tal forma que um volume igual de DNA de cada espécie viral fosse utilizado para testar a especificidade e eficiência dos primers, na reação de PCR.

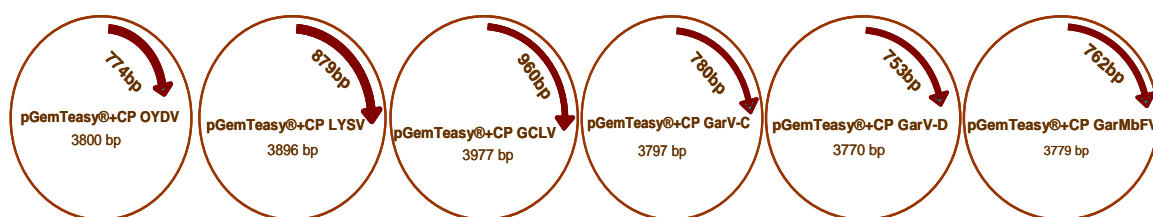


Fig. 2. Representação esquemática do Vetor (pGEM-T®Easy) contendo o gene completo da capa protéica de cada espécie viral. *Onion yellow dwarf virus* (OYDV); *Leek yellow stripe virus* (LYSV); *Garlic commom latent virus* (GarCLV); *Garlic virus C* (GarV-C); *Garlic virus D* (GarV-D); *Garlic mite-borne filamentous vírus* (GarMbFV).

2. Síntese de oligonucleotídeos e teste de eficiência para a detecção de *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus*

Os pares de oligonucleotídeos (Tab. 4) específicos foram sintetizados a partir da sequência do gene da capa protéica das seis espécies detectadas e caracterizadas no Brasil (Fajardo *et al.*, 2001; Melo Filho *et al.*, 2006). Um par de primer degenerado (Tab. 4), gênero-específico para detecção de *Potyvirus*, foi sintetizado a partir da comparação das sequências do gene da capa protéica dos isolados brasileiros de OYDV e LYSV que estão depositadas no GenBank acessos AF228414 e AF228415, respectivamente.

Tab. 4: Sequência dos oligonucleotídeos específicos (primers) sintetizados a partir da sequência do gene da capa protéica de seis espécies virais que infectam alho nas principais regiões produtoras desta cultura do Brasil.

Espécie	Primer	Sequência	Segmento amplificado
			(em pares de bases)
OYDV	OYDV senso	5'CCATGGCAGGAGATGGGGAGGACGC3'	774pb
	OYDV anti-senso	5'CCATGGACATTCTAATACCAAGCAACG3'	
LYSV	LYSV senso	5'CCATGGCCGGCGACGAACTAGATGC3'	879pb
	LYSV anti-senso	5'CCATGGACTGCATATGCGCACCATC3'	
GarCLV	GarCLV senso	5'CCATGGCAGTGAGTCAAACAGAGG3'	960pb
	GarCLV anti-senso	5'CCATGGAGTCTGCATTGTTGGATCC3'	
GarV-C	V-C senso	5'CCATGGGTGGAGACAGCCTATCTG3'	780pb
	V-C anti-senso	5'CCATGGAAAACGTTAACATGAGAGGC3'	
GarV-D	V-D senso	5'CCATGGATGAACAAGGAAACAG3'	753pb
	V-D anti-senso	5'CCATGGAGAATGTGATCATTGGAGG3'	
GarMbFV	Mb senso	5'CCATGGACGACCCTGTTGACCCAA3'	762pb
	Mb anti-senso	5'CCATGGAGAACGTAATCATGGGAGG3'	
Poty Uni	Poty 1	5'GAATTCATGRTNTGGTGYATHGANAAYGG3'	317pb
	Poty 2	5'GAGCTCGCNGYTTCATYTGNRHDWKNGC3'	

Onion yellow dwarf virus (OYDV). *Leek yellow stripe virus* (LYSV). *Garlic common latent virus* (GarCLV). *Garlic virus C* (GarV-C). *Garlic virus D* (GarV-D). *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV). Poty Uni (par de primer universal para detecção de espécies do gênero *Potyvirus* que infectam o alho (*Allium sativum*)).

A especificidade dos oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação das sequências do gene da capa protéica do OYDV, do LYSV, do GarCLV, do GarV-C, do GarV-D e do GarMbFV foram testados em reação de PCR a partir de amostras do DNA plasmidial purificado. A eficiência do par de primers universais degenerados (Poty 1 e Poty 2) foi testada em reação de PCR utilizando-se como amostra o DNA plasmidial de OYDV e LYSV.

Para a realização dos testes, dois microlitros de DNA plasmidial purificado contendo o gene da capa protéica de cada espécie viral foram

incubados com 1,0 μL de primer específico senso e 1,0 μL de primer antissenso ou, semelhantemente, para o gênero-específico (10 μM), 1,0 μL de dNTPs (concentração de 10 mM), 5 μL de PCR Buffer (10X), 5,0 μL de cloreto de magnésio (MgCl_2) a 50 mM, 0,25 μL de Taq DNA Polymerase (5U/ μL), para um volume final de 50 μL . A reação foi processada em Termociclador ESCO[®] modelo Swift Maxi. A desnaturação foi realizada a 94°C/3 min, seguida de 30 ciclos de amplificação (94°C/1 min; 48°C/1 min e 30 seg; 72°C/1 min) e um ciclo final de 72°C/7 min, com uma modificação na temperatura de pareamento para o par de primers denominados PotyUni que foi de 45°C. Os produtos amplificados e o marcador (1 KB Ladder) foram aplicados em gel de agarose (1 %), submetidos à eletroforese e visualizados conforme item 1.

3. Produção das sondas não-radioativas vírus-específicas

Após a confirmação da eficiência dos primers pela correta amplificação do gene da capa protéica de cada espécie viral, a próxima etapa foi sintetizar as sondas não-radioativas para cada um dos vírus do complexo viral. Os fragmentos amplificados, a partir dos produtos das reações de PCR do item anterior, foram eluídos e purificados do gel seguindo o protocolo do Kit QIAquick Gel Extraction[®] (QIAGEN). Para a síntese das sondas não-radioativas por meio de PCR, utilizou-se 4 μL do DNA purificado o gene da capa protéica de cada espécie viral, incubados com 2 μL de primer específico senso e antissenso a 10 μM , 2 μL de dNTP Mix a 10 mM reduzido em 25% de 5-desoxitimidina-trifosfato (dTTP), 10,0 μL de PCR Buffer (10X), 10,0 μL de cloreto de magnésio (MgCl_2) a 50 mM, 0,5 μL de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (2,5U/ μL) e 0,5 μL de

Digoxigenina-11-2'-Deoxyuredina 5'-trifosfato, Alcalina (DIG-11-dUTP[®]-Roche) a 125 nmol, para um volume final de 100 µL. A reação foi processada em Termociclador ESCO[®] modelo Swift Maxi conforme descrito no item 2. Cinco microlitros do produto de cada reação de PCR e o marcador de tamanho de DNA (1 KB Ladder) foram aplicados em gel de agarose e visualizados conforme descrito no item 1. A incorporação da marcação com digoxigenina nas sondas produzidas foi confirmada para cada reação.

4. Detecção de vírus de alho por meio de Hibridização em “Dot Blot” com sondas não-radioativas

4.1. Metodologia de Hibridização por “Dot Blot” utilizando sondas não-radioativas

Um procedimento geral foi usado para a montagem e execução do referido teste via hibridização com sondas não radioativas marcadas com digoxigenina. Para aplicação das amostras a serem testadas, a membrana de nitrocelulose, modelo S&S NC[™], foi preparada seguindo as instruções do fabricante (Zeta-Probe membrane). Cinco microlitros das amostras testadas (ver detalhes abaixo) foram aplicados às membranas, submetidos à luz ultravioleta por 5 min para fixação dos ácidos nucléicos. Na etapa de bloqueio, as membranas foram acondicionadas em garrafa térmica de 50 mL contendo 5 mL de tampão de pré-hibridização Church (EDTA 1 mM, Na₂HPO₄ 0,5 M e SDS 7%) e transferidas para forno de hibridização aquecido a 65°C por 5 min. Em seguida, o tampão de pré-hibridização foi descartado e 50 µL da sonda não-radioativa previamente

desnaturada por aquecimento a 100°C, e posteriormente diluída em 5 mL de tampão Church foram adicionados as membranas. Estas foram incubadas sob agitação por uma noite a 65°C. Após 12 horas, a sonda foi armazenada em freezer a -20°C para ser reutilizada posteriormente. As membranas foram lavadas por duas vezes sob agitação durante 5 min com o tampão de lavagem I (2x SSC e SDS 0,1%) e durante 15 min com o tampão de lavagem II (0,5X SSC e SDS 0,1%) a uma temperatura de 65°C. Após a retirada do tampão de lavagem II, adicionou-se 10 mL do tampão de bloqueamento (1X PBS e agente bloqueador 0,5%) que foi incubado por 1h em temperatura ambiente. Decorrido esse período, o anticorpo anti-Digoxigenina AP[®] (1:10.000) foi diluído em tampão de bloqueio e incubado por 1h. Em seguida, as membranas foram lavadas por três vezes em tampão (0,5 X PBS e Tween 0,01 %) e reveladas com 1 mL de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato (BCPI) a 10 X e 1 mL de Nitroblue Tetrazolium Salt (NBT) a 10X (Zymed[®]) e mantidas no escuro por até 12 h. Ao final da reação, as membranas foram mergulhadas em água destilada para a paralisar a reação.

4.2. Limite de detecção das sondas não radioativas marcadas com digoxigenina

Alíquotas dos fragmentos de PCR purificados correspondentes aos genes da capa protéica de cada vírus avaliado conforme descrito item 3, foram quantificados e diluídos em cinco concentrações seriadas (3,33 ng/μL , 0,3 ng/μL, 0,03 ng/μL , 0,003 ng/μL e 0,0003 ng/μL) visando a determinação do limite de detecção das sondas não-radioativas marcadas

com digoxigenina. O protocolo de hibridização foi realizado conforme descrito no item 4.1.

4.3. Métodos de obtenção de extrato bruto e RNA total de tecido foliar para detecção via Hibridização em “Dot Blot”

4.3.1. Extrato bruto de tecidos foliares

Amostras de folhas de alho de plantas sadias e infectadas, cultivadas na Estação Experimental da Universidade de Brasília, foram utilizadas com intuito de se avaliar a eficiência de detecção viral com sondas não-radioativas. Três metodologias recomendados para a obtenção de extrato bruto de plantas foram testadas nesse trabalho. No primeiro método, 150 mg de tecido foliar fresco foram macerados em tampão 0,5 X PBS + Tween a 0,01 %, pH 7,2, e o sobrenadante resultante foi coletado e armazenado. No segundo método (Thomson & Dietzgen, 1995), 300 µL de tampão de extração (100 mM de Tris-HCl, 1,0 M de KCl e 10 mM de EDTA) foram adicionados a 150 mg de tecido fresco previamente triturado em nitrogênio líquido. Em seguida, a mistura foi incubada em banho-maria por 20 min a 65°C e centrifugada por 5 min, a 1800 g a 4°C. Após centrifugação o sobrenadante foi coletado e diluído em 30 µL de água MilliQ tratada com DEPC. No terceiro método, (El-Ela *et al.*, 2006), 300 µL de tampão de extração (acetato de sódio 0,5 M, MgCl₂ 10 mM, etanol 20%, SDS 3 % e NaCl 1 M) foram utilizados para macerar 150 mg de tecido fresco. Em seguida, um volume igual de clorofórmio foi acrescentado ao homogeneizado e incubou-se por 5 min a 37°C, e imediatamente centrifugou-se a seguir a 1800 g por 3 min. Ao

final do procedimento, a fase aquosa foi coletada. Todas as etapas de extrações testadas foram realizadas em tubos eppendorfs de 2,0 ml.

4.3.2. Extração de RNA total de folhas sadias e infectadas

Dois métodos de extração de RNA total foram comparados. O primeiro protocolo é conhecido como o “método de extração de RNA do Tabaco” com algumas modificações (Verwoerd *et al.*, 1989). Cento e cinquenta miligramas de amostra foram trituradas em nitrogênio líquido, em tubos eppendorf de 2 mL. Em seguida foram acrescentados 600 µL de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM pH 8,0, EDTA 200 mM pH 8,0 e SDS 1%) e o homogeneizado foi incubado no gelo por 1 min. Após esse período centrifugou-se as amostras por 15 min, a 1800 g a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:25:1) foi adicionado a solução, que foi homogeneizada e centrifugada por mais 15 min, transferindo-se o sobrenadante para um novo tubo. A este, adicionou-se um volume de fenol que foi novamente homogeneizado, centrifugado e transferido para um novo tubo. Em seguida acrescentou-se igual volume da mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e os mesmos procedimentos foram realizados. Igual volume de cloreto de lítio (LiCl) 4 M foi adicionado ao sobrenadante resultante e incubado-se por 12 h a 4°C. Decorrido o período de incubação, a solução foi centrifugada a 1800 g a 4°C por 20 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado, por três vezes, com 200 µL de Etanol 70% gelado sendo posteriormente centrifugado durante 5 min. O sedimento foi ressuspendido em 50 µL de

água MilliQ, tratada com DEPC e autoclavada. O RNA total foi armazenado em freezer -80 °C.

O segundo método de extração testado foi mais rápido e simples de ser executado, porém, mais oneroso do que o primeiro pelo custo do Kit de extração da digoxigenina. Cento e cinquenta miligramas de folhas foram trituradas em nitrogênio líquido, em tubos eppendorf de 2 mL. Em seguida, 500 µL do reagente “Plant Extraction Reagent[®]” (Invitrogen) foram adicionados à amostra homogeneizada. Centrifugou-se as amostras por 2 min, 1800 g a 25°C, e o sobrenadante resultante foi coletado. Em seguida foram adicionados 100 µL de NaCl 5M e 300 µL de clorofórmio e, após a homogeneização foi realizada uma nova centrifugação, nas mesmas condições descritas acima. O sobrenadante foi coletado em um microtubo novo de 1,5 mL. A este, foi acrescentado um volume de isopropanol equivalente ao volume do sobrenadante. A mistura foi colocada em repouso por um período de 10 min, após o qual as amostras foram centrifugadas a 1800g, por mais 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado lentamente e o sedimento lavado com 1 mL de etanol 75%, seguido de uma centrifugação de 1800 g por 2 min. Todo o excesso de álcool foi retirado com uma pipeta e o sedimento foi seco e ressuscitado em 20 µL de água MilliQ, tratada com DEPC e autoclavada. O RNA total foi armazenado em freezer a -80°C.

4.3.3. Detecção do complexo viral do alho em extrato bruto e RNA total de folhas via Hibridização em “Dot Blot”

Cinco microlitros de cada amostra proveniente dos diferentes métodos de obtenção de extrato bruto de folhas e de RNA total foram diluídos v/v a concentrações de 1:1; 1:10; 1:100; 1:1000 e 1:10000, e aplicados em seis membranas, para a detecção específica das seis espécies virais, via Hibridização em “Dot Blot”, com as sondas não-radioativas marcadas com digoxigenina produzidas, conforme protocolo descrito no item 4.1.

5. Detecção das espécies do complexo viral via RT-PCR

5.1. Extração do RNA total e Reação de Transcrição Reversa (RT)

O RNA total utilizado para a síntese do cDNA foi extraído de acordo com o protocolo do kit “Plant Extraction Reagent[®]” (Invitrogen) do item 4.3.2, a partir de amostras de alho provenientes de várias áreas produtoras do Brasil (Tab. 8, cap III).

A reação de transcrição reversa foi realizada de acordo com o protocolo da enzima M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverse transcriptase do fabricante, Promega[®] adicionando-se à reação 10 µM do primer específico T1: 5'-CCTGCAGGATCCTTAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' cedido pelo pesquisador Dr. Bergmann Ribeiro da Universidade de Brasília (Rodrigues *et al.*, 2001), que parecia com a cauda de poly-A dos RNA mensageiros de todos os seis vírus e 2 µL de RNA total extraído conforme o protocolo acima. A mistura foi incubada a 37°C por 60 min, de acordo com as instruções do fabricante.

5.2. Reação de RT-PCR

Para a detecção de cada espécie viral nas amostras por RT-PCR, foram utilizados 2 µL do cDNA, incubados com 0,5 µL de cada primer específico (senso e antissenso) a 10 µM (Tab. 4), 0,5 µL de dNTP Mix a 10 mM, 5,0 µL de Green Go Taq[®] Reaction Buffer 5X e 0,125 µL de Go Taq[®] DNA polymerase (1,25 U), para um volume final de 25 µL. A reação foi amplificada em Termociclador ESCO[®] modelo Swift Maxi utilizando-se os seguintes parâmetros na reação: desnaturação foi realizada a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de amplificação (94°C/1 min; 60°C/1 min; 72°C/1 min) e um ciclo final de 72°C/ 7 min para extensão final.

Como controles positivo e negativo, utilizou-se o DNA plasmidial, contendo o gene da capa protéica de cada espécie viral a ser detectado e a amostra sem DNA (água MilliQ tratada com DEPC e autoclavada), respectivamente, em cada conjunto de reações de RT-PCR realizada.

Os produtos amplificados e o marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen[®]) foram aplicados em gel de agarose a 0,8%, preparado em tampão 0,5 x Tris-Borato-EDTA (TBE), submetidos à eletroforese (120 V), corados com brometo de etídio a 0,1 mg/mL e visualizados sob luz ultravioleta no aparelho Alpha Innotech[®].

5.3. Verificação da qualidade dos RNAs totais extraídos para as reações de RT-PCR

Além da utilização dos controles positivo e negativo, foi utilizado para validação do método de extração e RT-PCR, o par de primers EF1F (5'-TGTTGCTGTTAAGGATTTGAAGCG-3') e EF1R (5'-AACAGTTTGACGCATGTCCCTAAC-3'), cedido pelo Dr. Francisco Aragão, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen),

que amplifica uma região interna do RNA mensageiro de um gene que codifica o fator de alongação *EF-1 α* , em plantas, correspondendo em *Passiflora edulis* e *Glycine max* a um fragmento de 358 pb (Abreu & Aragão, 2007 e Nunes *et al.*, 2006).

Amostra de RNA total de plantas infectadas com o GarV-C, o GarV-D e o GarMbFV (BA31) e três amostras negativas provenientes de produtores de alho (RS20, MG38 e MG39) (Tab. 8, capIII) foram testadas com os primers EF1F e EF1R a fim de se verificar a integridade do RNA total extraído. Como controles positivo e negativo utilizaram-se, respectivamente, DNA total de tomate (*Solanum lycopersicum*) cedido pelo Dr. Érico de Campos Dianese e amostras de cDNA provenientes de uma planta de alho comprovadamente livre de vírus (CT1). A reação foi processada em Termociclador ESCO, Modelo Swift Maxi, e seguiu o protocolo descrito no item 2.5, com modificações na temperatura de anelamento e número de ciclos (desnaturação a 94°C por 3 min, seguida de 35 ciclos de 94°C/1 min; 52°C/1 min; 72°C/1 min e uma extensão final de 72°C/7 min).

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1%, conforme descrito no item 1.

6. Detecção do complexo viral do alho por NCM-Elisa, Hibridização por “Dot Blot” e RT-PCR

6.1. Procedência e coleta das amostras

As amostras de folhas de plantas de alho em pleno estágio vegetativo foram coletadas em campo experimental e telado antiafídeo da Embrapa Hortaliças, em julho de 2009 (Tab. 5). Após a coleta, as

amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em recipiente refrigerado. As análises foram realizadas no Laboratório de Virologia Vegetal da Embrapa Hortaliças, por NCM-Elisa, e no laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB por Hibridização em “Dot Blot” e por RT-PCR.

As cultivares oriundas de telado antifídeo são provenientes do programa de produção de alho livre de vírus, anteriormente mencionado. As amostras de campo (controle positivo) foram fazer parte do banco de germoplasma de alho da Embrapa Hortaliças, multiplicadas em campo e, portanto, sujeitas a reinfecção viral. As plantas 01 e 02, da cv. Cateto Roxo, foram originalmente indexadas por ISEM e, anualmente, são testada por NCM-Elisa, e considerada livre de vírus (controle negativo).

Tab. 5: Amostras de plantas de alho (*Allium sativum*) analisadas provenientes da Embrapa Hortaliças.

Cultivar	Planta-Código	Procedência
Hozan	01	Telado
Hozan	03	Telado
Hozan	09	Telado
Quitéria	190	Telado
Quitéria	232	Telado
Quitéria	260	Telado
Chonan	115-1	Telado
Chonan	115-2	Telado
Cateto Roxo	-----	Telado
Amarante	01	Telado
Amarante	04	Telado
Cateto Roxo	01- controle (-)	Telado
Cateto Roxo	02- controle (-)	Telado
Cateto Roxo	controle (+)	Campo
Amarante	controle (+)	Campo

Controle positivo (+). Controle negativo (-).

6.2. NCM-Elisa

Um grama de cada amostra foi triturado em 1 mL de tampão de Elisa (TEs) 0,5 X PBS e 0,01% de Tween 20, diluídas em três concentrações (1:5; 1:50 e 1:500) e aplicadas em membranas de nitrocelulose previamente tratadas com etanol (70%) e TEs. Após a imobilização das amostras, as membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado (2%) diluído em TEs e submetidas a agitação leve por 2h. Decorrido o tempo de agitação, o agente bloqueador foi descartado, e adicionaram-se os antissoros (fração IgG 1 mg/ml) contra o OYDV, o LYSV e o antissoro polivalente previamente diluídos, em 1 mL de extrato de planta sadia triturado com 0,5 X PBS e ajustado para a diluição final de 1:1000 (v/v). Cada membrana foi incubada por 4h sob agitação. Ao final do período, os antissoros foram descartados e as membranas foram lavadas por 3 vezes com TEs. Foi adicionado o anti-anticorpo conjugado com a fosfatase alcalina diluído 1:2000 em 0,5 X PBS, incubando-se, sob agitação, em temperatura ambiente por 3 h. Decorrido o tempo de incubação, as membranas foram lavadas por 3 vezes durante 5 min cada e reveladas com NBT e BCPI diluídos (de acordo com instruções do fabricante) em tampão de revelação pH 9,5 (NaCl 10 mM, Tris 100 mM e MgCl₂ 5 mM) em agitação no escuro por, no mínimo, 30 min. A reação foi paralisada com a imersão das membranas em água destilada.

6.3. Detecção por Hibridização em “Dot Blot” e RT-PCR

O processamento das amostras consistiu da extração de RNA total de acordo com o protocolo do kit Plant RNA Reagent (Invitrogen®) para todas as análises. Para o “Dot Blot” as amostras foram diluídas 1:5 (v/v)

em água MilliQ tratada com DEPC e autoclavada, e aplicadas às membranas. Em seguida, foram submetidas à hibridização com as sondas não-radioativas marcadas com digoxigenina para a detecção de OYDV e LYSV, conforme protocolo descrito no item 5.1.

As reações de RT-PCR foram conduzidas, de acordo com os procedimentos descritos nos itens 5.1 e 5.2, utilizando-se os seis primers espécie-específicos (Tab. 4).

III) RESULTADOS

1. Desenvolvimento de sondas moleculares espécie-específicas e gênero-específica para os vírus do complexo viral do alho

O gene da capa protéica de cada espécie viral do complexo do alho, caracterizado no Brasil, foi amplificado com o par de oligonucleotídeos específicos. As bandas obtidas apresentaram o tamanho esperado para a sequência do gene da capa protéica de cada espécie do complexo viral, sendo que, os fragmentos amplificados foram de aproximadamente: 774 pb, 879 pb, 960 pb, 780 pb, 753 pb e 762 pb, para o OYDV, o LYSV, o GARCLV, o GarV-C, o GarV-D e o GarMbFV, respectivamente (Fig. 3. A). Os fragmentos obtidos foram purificados do gel e o DNA resultante utilizado em uma nova reação de PCR para a produção de sondas moleculares espécie-específica via incorporação do marcador digoxigenina através do uso do Kit "DIG-11-dUTP[®]" (Fig. 3. B).

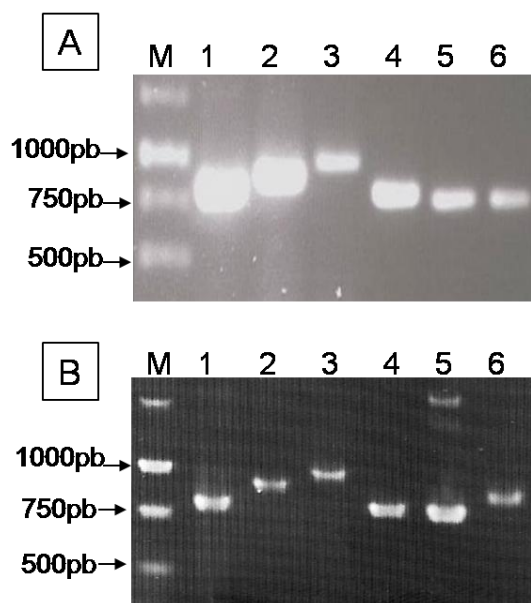


Fig. 3. A: Produtos de PCR amplificados a partir do gene da capa protéica de cada espécie viral com um par de oligonucleotídeos específicos. B: Sondas não-radioativas, para a detecção dos vírus do complexo viral do alho, obtidas a partir da amplificação do gene da capa protéica de cada espécie viral com um par de oligonucleotídeos específicos e incorporação de Digoxigenin-11-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato, alcalina-lábil (DIG-11-dUTP[®]). M- 1kb DNA ladder. 1- *Onion yellow dwarf virus* (OYDV)- 774 pb. 2- *Leek yellow stripe virus* (LYSV)- 879 pb. 3- *Garlic commom latent virus* (GarCLV)- 960 pb. 4- *Garlic virus C* (GarV-C)- 780 pb. 5- *Garlic virus D* (GarV-D)- 753 pb. 6- *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV)- 762 pb.

O par de oligonucleotídeos degenerados utilizado para a produção de sonda gênero-específica (Tab. 4) amplificou, por PCR, um fragmento de aproximadamente 317 pb a partir do DNA plasmidial do gene da capa protéica de OYDV e de LYSV. O marcador digoxigenina (DIG-11-dUTP[®]) foi incorporado à sonda molecular gênero-específica através de uma nova reação de PCR (Fig. 3).

A sonda gênero-específica foi testada para hibridização com produtos de PCR provenientes da amplificação do gene da capa protéica

de OYDV, de LYSV e de uma mistura de produtos de PCR de seis vírus (OYDV, LYSV, GARCLV, GarV-C, GarV-D e GarMbFV), obtidos pela amplificação do cDNA do gene da capa protéica de cada espécie viral por primers espécie-específicos. Esta sonda apresentou reação positiva para todos os produtos (Fig. 5). O limite de detecção da sonda não foi testado.

Não foi observada reação positiva para detecção do complexo viral do alho em extrato bruto de folhas de alho ou do RNA total de amostras de alho infectadas com a hibridização em “Dot-Blot”.

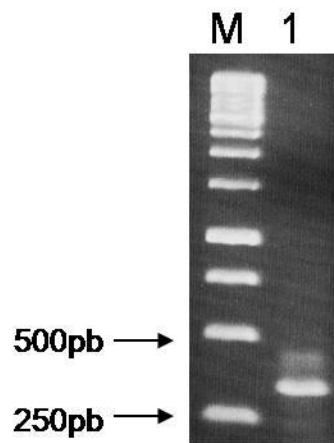


Fig. 4. Sonda não-radioativa (fragmento de 317 pb) obtida a partir da amplificação do gene da capa protéica de OYDV, por um par de oligonucleotídeos específicos para o gênero *Potyvirus* via incorporação de DIG-11-dUTP[®]. M- 1kb DNA ladder. 1- *Onion yellow dwarf virus* (OYDV).

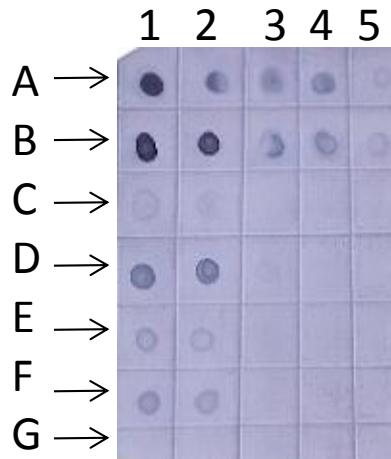


Fig. 5. Detecção de *Potyvirus* por Hibridização em “Dot Blot” com sondas moleculares não-radioativas gênero-específica para *Potyvirus*. A e C- DNA plasmidial contendo o gene da capa protéica de *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) e *Leek yellow stripe virus* (LYSV), respectivamente. B e D e Produtos de PCR obtidos a partir da amplificação do gene da capa protéica de OYDV e LYSV, respectivamente. E- Mistura de seis produtos de PCR obtidos a partir da amplificação do gene da capa protéica de cada espécie viral: OYDV, LYSV, GARCLV, *Garlic vírus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D) e *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV), com primers específicos. F- Produto de PCR obtido a partir da amplificação do gene da capa protéica de LYSV com um par de primer específico para o gênero *Potyvirus*. G - Produtos de PCR obtidos a partir da amplificação do gene da capa protéica de *Garlic common latent virus* (GarCLV) com primers específico (controle negativo). 1 a 5- Diluições seriadas dos produtos aplicados: 1, 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000, respectivamente.

2. Sensibilidade das sondas não-radioativas desenvolvidas para a detecção dos vírus do complexo viral do alho

As sondas não-radioativas espécie-específicas foram eficientes para detectar todos os fragmentos virais homólogos (usados como controles positivos) purificados a partir de reações específicas de PCR na maior concentração (0,03 ng/ μ L), para todas as espécies virais (Fig. 6, A1 - F1). A sonda específica para o GarCLV foi a mais sensível, detectando

o DNA viral até 0,003 ng/ μ L (Fig. 6).

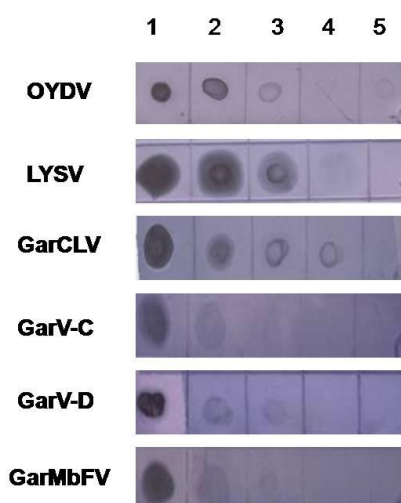


Fig. 6. Sensibilidade de seis sondas não radioativas marcadas com digoxigenina na detecção específica de espécies do complexo viral do alho via Hibridização em “Dot Blot”. Produtos de PCR purificados a partir da amplificação, com oligonucleotídeos específicos, do cDNA do gene da capa protéica de *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Leek yellow stripe virus* (LYSV), *Garlic common latente virus* (GarCLV), *Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D) e *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV), respectivamente. 1 a 5 –Diluições seriais dos produtos virais purificados: 3,33 ng/ μ L, 0,3 ng/ μ L, 0,03 ng/ μ L, 0,003 ng/ μ L e 0,0003 ng/ μ L, respectivamente.

3. Detecção do complexo viral via RT-PCR

3.1. Especificidade da reação de PCR para amplificação de vírus do complexo do alho

Os produtos das reações de PCR específicas para amplificar os genes das capas protéicas dos vírus do complexo do alho a partir do DNA plasmidial purificado foram carregados em gel de agarose em diluições seriadas da reação de PCR (1:5; 1:50; 1:500; 1:5000 e 1:50000), sendo possível visualizar no gel os fragmentos amplificados até uma diluição de 1:5 para o OYDV, GaV-C e o GarMbFV. O LYSV foi detectado em uma

diluição de até 1:50 e o GarCLV e o GarV-D não foram visualizados nos géis nas diluições empregadas (Fig. 7. A), no entanto, as amplificações puderam ser mostradas com o uso de sondas específicas como demonstrado nos experimentos de hibridização (Fig, 7).

Visando aumentar a capacidade de detecção das espécies virais do complexo do alho, amostras de PCR semelhantes àquelas carregadas em gel de agarose foram hibridizadas em “Dot Blot” com as sondas moleculares espécie-específica nas mesmas diluições seriadas utilizadas para a detecção em gel de agarose (1:5; 1:50; 1:500; 1:5000 e 1:50000) (Fig. 7. B). Com o uso das sondas, os produtos de PCR de OYDV, GARCLV, GarV-C, GarV-D e GarMbFV foram visualizados até uma diluição de 1: 50. As amostras de LYSV foram visualizadas até uma diluição de 1:50.000. Também foi observado que as sondas utilizadas para a detecção do GarV-D e GarMbFV apresentaram reação cruzada indicando possível homologia de sequências na região do gene da capa protéica desses vírus.

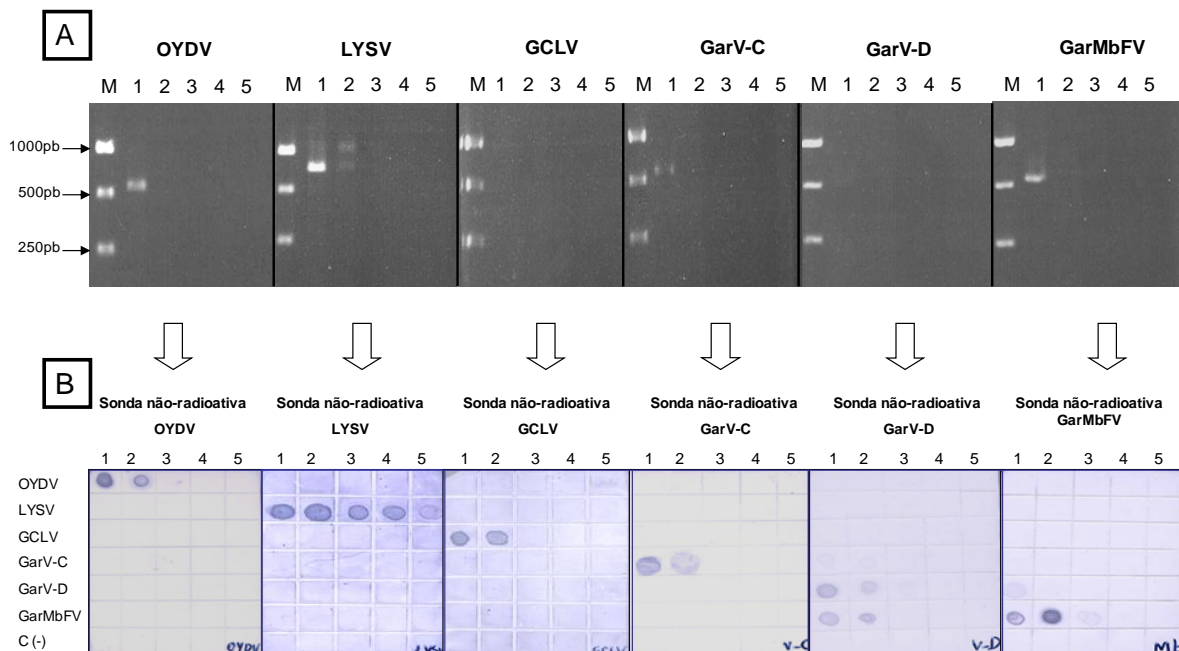


Fig. 7. Análise comparativa da visualização do produto de PCR em diluições seriadas via em gel de agarose e sonda molecular não-radioativa. 1 a 5 – Diluição seriada do produto de PCR (1:5; 1:50; 1:500; 1:5000 e 1:50000) obtidos a partir da amplificação do DNA plasmidial contendo o gene da capa protéica de cada espécie do complexo viral do alho (*Allium sativum*) com oligonucleotídeos específicos. A- Visualização do produto de PCR em gel de agarose (0,8 %). M- Marcador 1 kb DNA ladder; B- Visualização do produto de PCR hibridizado com sonda molecular não-radioativa. Controle negativo [C (-)] - produto de PCR contendo a sequência de nucleotídeos do gene de *Tospovirus* que codifica a proteína NSs. *Onion yellow dwarf virus* (OYDV). *Leek yellow stripe virus* (LYSV). *Garlic common latent virus* (GarCLV). *Garlic virus C* (GarV-C). *Garlic virus D* (GarV-D). *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV).

3.2. Amplificação dos vírus do complexo do alho via RT-PCR a partir de extratos de RNA total de plantas

A qualidade das extrações de RNA total das amostras de plantas a serem testadas foi analisada por meio dos cDNA sintetizados à partir do RNA total empregando-se um par de primer específico de um gene endógeno de plantas. Tanto para as amostras infectadas, como sadias, foi amplificado um fragmento de aproximadamente 358 pb (Fig. 8), que

corresponde a uma seqüência interna de um gene conservado como fator de alongação na maioria das plantas. Sendo assim, em materiais infectados e sadios, o RNA total se apresentou intacto, garantindo a eficiência do processo de extração e possibilitando a síntese dos cDNA alvos nas reações posteriores de detecção viral.

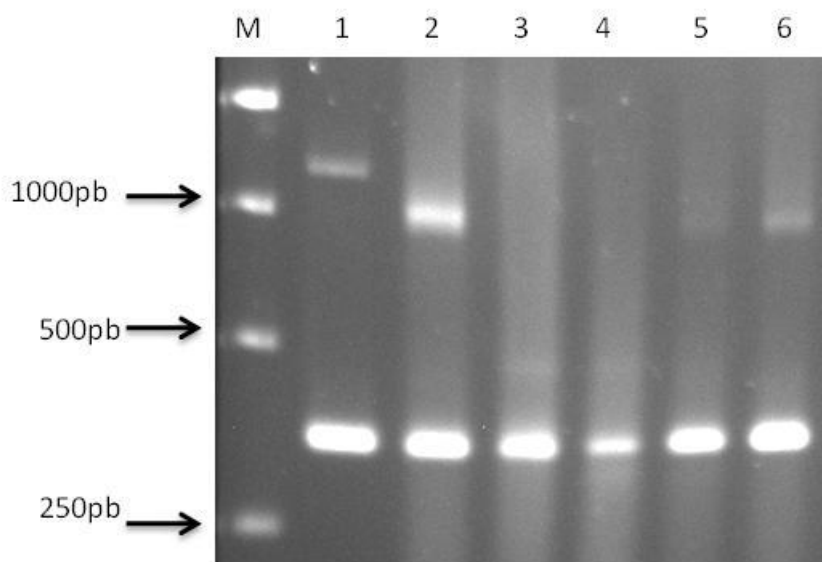


Fig. 8. Avaliação da eficiência da extração de RNA total de plantas através da amplificação de um fragmento de 358 pb com um par de primers EF1F (5'-TGTTGCTGTTAAGGATTTGAAGCG-3') e EF1R (5'-AACAGTTTGACGCATGTCCCTAAC-3'), específicos para a porção interna de um gene conservado correspondente a um fator de alongação na maioria das plantas. M- Marcador 1Kb DNA ladder. 1- Controle Positivo: DNA do gene *Vir* do tomateiro (*Solanum lycopersicum*). 2 a 6 - cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído de plantas de alho (*Allium sativum*) provenientes de: cultura de tecidos (CT1) – livre de vírus; planta de alho amostra BA31 infectada com três *Allexivirus*; plantas de alho amostra RS20, MG38 e MG39 isentas de infecção; respectivamente.

A técnica de RT-PCR assegurou uma detecção específica e rápida de espécies virais componentes do complexo viral do alho nas amostras provenientes das principais regiões produtoras do país. Através desta técnica foi possível detectar duas ou mais espécies de vírus em vários

lotes de alho-semente avaliados, como na amostra do lote MG21, que apresentou infecção mista de OYDV com GarCLV (Fig. 9, Anexo Tab. 1) . A detecção das espécies de *Allexivirus* por RT-PCR foi específica apresentando fragmentos de tamanho esperado (Fig. 9).

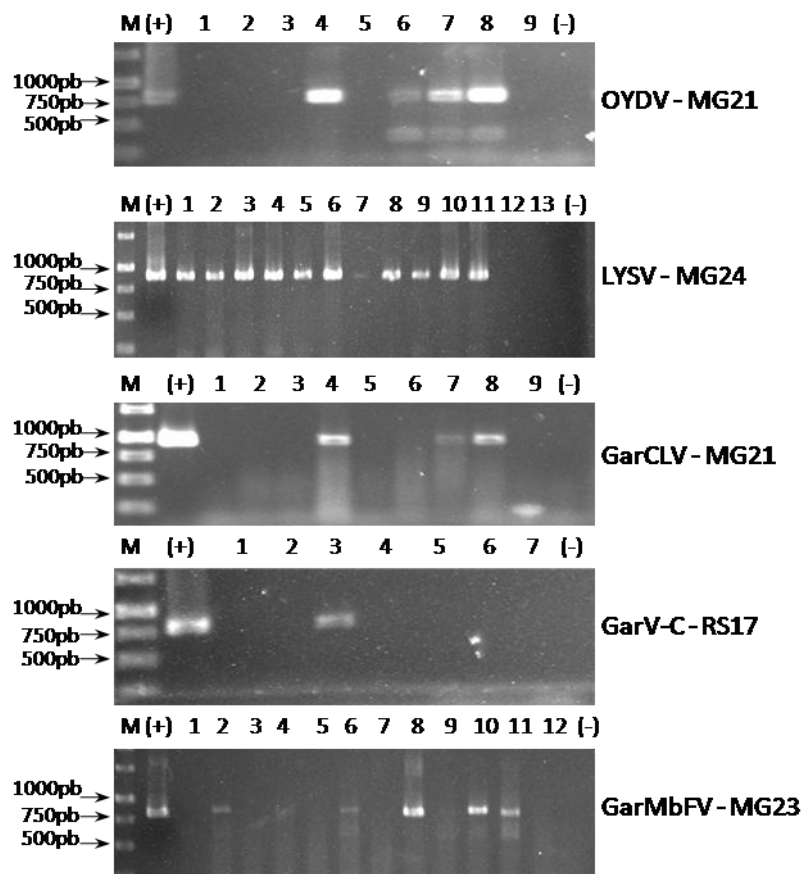


Fig. 9. Detecção do complexo viral do alho por RT-PCR com primers vírus-específicos em amostras de plantas provenientes das principais áreas produtoras do Brasil. M- Marcador 1kb DNA ladder. Controle Positivo (+): DNA plasmidial contendo o gene de capa protéica de cada espécie viral. 1 a 13: produtos de RT-PCR sintetizados a partir da amplificação de RNA total de amostras de alho provenientes de diversas regiões do Brasil, com primers vírus-específicos. Controle negativo (-): Amostra contendo tampão da reação de RT-PCR Vírus testados: *Onion yellow dwarf virus* (OYDV); *Leek yellow stripe virus* (LYSV); *Garlic common latent virus* (GarCLV); *Garlic virus C* (GarV-C); *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV). Código identificador: Amostras provenientes de Minas Gerais lotes 21, 23 e 24 (MG21, MG23 e MG24,

respectivamente) e do Rio Grande do Sul lote 17 (RS17).

4. Comparação de métodos de detecção de espécies do complexo viral do alho via NCM-Elisa e RT-PCR

A detecção comparativa dos seis vírus do complexo do alho foi realizada com as técnicas NCM-Elisa e RT-PCR. Pela sorologia, apenas nas amostras de campo observaram-se resultados positivos para o OYDV e LYSV. No entanto, na reação de RT-PCR, apenas o OYDV foi detectado nas mesmas amostras (Tab. 6 e 7). Além dos *Potyvirus*, a RT-PCR detectou ainda o GarCLV, o GarV-D e o GarMbFV em algumas amostras, o que não foi detectado pelo antissoro polivalente. Para esses vírus não estavam disponíveis antissoros específicos.

Tab. 6: Detecção do complexo viral do alho por NCM-Elisa com antissoros policlonais em amostras do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças.

NCM-Elisa			
Cultivar	Polivalente	OYDV	LYSV
Hozan (01)	-	-	-
Hozan (03)	?	-	-
Hozan (09)	-	-	-
Quitéria (190)	-	-	-
Quitéria (232)	-	-	-
Quitéria (260)	-	-	-
Chonan (115-1)	-	-	?
Chonan (115-2)	-	-	?
Cateto Roxo	-	-	-
Amarante (01)	-	-	-
Amarante (04)	-	-	-
Cateto Roxo (01) - C(-)	-	-	-
Cateto Roxo (02) – C(-)	-	-	-
Cateto Roxo - C(+)	+	+	+
Amarante - C(+)	+	+	+

NCM-Elisa: Elisa em membrana de nitrocelulose. Controle negativo: C(-). Controle positivo: C(+), amostras sujeitas a re-infecção, em campo, por mais de 10 anos consecutivos. Ausência de vírus: (-). Presença de vírus: (+). Resultado inconclusivo: ?. Polivalente: antissoro contra o purificado do complexo viral. OYDV: antissoro contra *Onion yellow dwarf virus*. LYSV: antissoros contra *Leek yellow stripe virus*.

Tab. 7: Detecção viral em amostras de alho provenientes do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças por RT-PCR com primers específicos para espécies do complexo viral do alho.

Cultivar	RT-PCR					
	OYDV	LYSV	GarCLV	GarV-C	GarV-D	GarMbFV
Hozan (01)	-	-	-	-	-	-
Hozan (03)	-	-	-	-	-	-
Hozan (09)	-	-	-	-	-	+
Quitéria (190)	-	-	-	-	-	-
Quitéria (232)	-	-	-	-	+	-
Quitéria (260)	-	-	-	-	+	-
Chonan (115-1)	-	-	-	-	-	-
Chonan (115-2)	-	-	-	-	-	-
Cateto Roxo	-	-	-	-	-	-
Amarante (01)	-	-	+	-	-	-
Amarante (04)	-	-	+	-	-	-
Cateto Roxo (01) - C(-)	-	-	+	-	+	-
Cateto Roxo (02) - C(-)	-	-	+	-	+	-
Cateto Roxo - C(+)	+	-	-	-	-	-
Amarante - C(+)	+	-	-	-	+	-

Controle negativo: (-). Controle positivo: (+), amostras sujeitas a re-infecção, em campo, por mais de 10 anos consecutivos. Ausência de vírus: -. Presença de vírus: +. *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Leek yellow stripe virus* (LYSV), *Garlic common latent virus* (GarCLV), *Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D) e *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV).

IV) DISCUSSÃO

Seis pares de primers espécie-específicos foram sintetizados, apresentado 100% de homologia com os isolados brasileiros depositados no GenBank, para amplificar o gene da capa protéica de OYDV, de LYSV, de GarCLV, de GarV-C, de GarV-D e de GarMbFV que infectam a cultura do alho, no Brasil. O alinhamento desses pares de primers com outros isolados depositados no GenBank, possibilitaram uma maior segurança na detecção de novos isolados, visto que foi observada alta homologia com todas as sequências depositadas. Além dos primers específicos, um par de primers degenerados gênero-específico para *Potyvirus* foi sintetizado para amplificar um fragmento interno no gene da capa protéica dos *Potyvirus* OYDV e LYSV.

Todos os pares de primers utilizados amplificaram os seus respectivos DNAs molde (DNA plasmidial contendo o gene da capa protéica de cada espécie viral) a uma temperatura de anelamento de 60 °C, comum a todas as reações (Fig. 3. A), conforme foi visualizado na análise em gel e nos experimentos de hibridização com sondas moleculares. Os resultados não foram positivos exceto para o par de primer degenerado que foi testado em temperaturas de anelamento de 47 °C. A sistematização das mesmas condições de reação facilitou o processamento simultâneo das reações de RT-PCR com os diferentes primers para detecção das espécies do complexo viral.

A não visualização em gel dos produtos de PCR amplificados para GarCLV e o GarV-D, indicou que para esse dois vírus as condições de PCR estabelecidas parecem não ter sido otimizadas, provavelmente, devido a

temperatura de anelamento estabelecida como padrão.

Foi possível, a partir dessas reações de PCR, produzir as sondas moleculares não-radioativas espécie-específicas (Fig. 3) que detectaram via hibridização o cDNA do gene capa protéica de cada espécie viral. Apesar das sondas produzidas apresentarem sensibilidade superior à capacidade de detecção via sorologia (Fig. 6), elas não detectaram os vírus no extrato bruto nem no RNA total das amostras. Resultado semelhante foi obtido por Melo Filho (2003) que não detectou o complexo viral do alho no extrato bruto ou no RNA total.

Melo Filho (2003) sugeriu os ajustes nos protocolos de preparação das amostras aprimorando o processo de extração. Seguindo essas orientações, foram realizados três métodos de obtenção de extrato bruto e dois de RNA total. No entanto, os diferentes métodos utilizados não permitiram a detecção com sondas moleculares. Porém, o método de obtenção de RNA total com o “Plant RNA Reagent” foi utilizado com sucesso para detecção do complexo viral por RT-PCR nas amostras de alho analisadas no presente trabalho (Anexo, Tab. 1).

Dois fatores foram abordados para tentar explicar a ausência de resultados na hibridização. O primeiro fator seria a não-desnaturação das amostras provenientes de extrato bruto ou de RNA total de folhas previamente aplicadas às membranas. A desnaturação dos extratos foi utilizada por Shibolet *et al.* (2001) que obtiveram resultados positivos na detecção do complexo viral do alho por Hibridização em “Dot Blot” com sondas não-radioativas. O segundo fator foi a utilização do substrato (NBT e BCPI) para a detecção da digoxigenina. Estes têm sido

gradativamente substituídos pela revelação baseada na quimioluminescência devido à sua maior sensibilidade de detecção de reações de hibridização. Vários trabalhos, em diferentes patossistemas, têm utilizado amostras de RNA total denaturadas na Hibridização em “Dot Blot” com sondas moleculares não-radioativas aliadas à detecção via quimioluminescência e os resultados têm sido satisfatórios (Sanchez-Navarro *et al.*, 1998; Shibolet *et al.*, 2001; Ivars *et al.*, 2004). Assim, recomenda-se uma repetição dos procedimentos de Hibridização em “Dot Blot” realizando a desnaturação prévia dos extratos brutos e dos RNA totais e a revelação por quimioluminescência como substrato específico para a avaliação da eficiência das sondas.

Em contraste com os resultados negativos, obtidos com o uso de sondas moleculares, a técnica de RT-PCR mostrou-se sensível na detecção específica dos da maioria dos vírus do complexo do alho. Vários trabalhos já demonstraram que esta técnica é altamente sensível para a detecção dos vírus de alho e pode ser utilizada para desenvolver um sistema de indexação desses patógenos (Takaichi *et al.*, 1998; Dovas *et al.*, 2001; Shibolet *et al.*, 2001; Fajardo *et al.*, 2001; Melo Filho *et al.*, 2004).

Recentemente, algumas variantes da RT-PCR têm surgido com os objetivos de: simplificar o procedimento de captura do RNA molde, como a Imuno-captura (IC)-RT-PCR (Lunello *et al.*, 2005); aliar as vantagens da técnica molecular e sorológica, como o *Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay* (DAS-Elisa)-RT-PCR (Lunello *et al.*,

2005); aumentar a sensibilidade da reação através da PCR em tempo real (Lunello *et al.*, 2004).

No presente trabalho a técnica de RT-PCR foi ajustada para a detecção em larga escala do complexo viral do alho (Fig. 8) conforme protocolo estabelecido (item II, 5). Dos métodos de extração de RNA total testados, o do Kit “Plant RNA Reagent” (Invitrogen®) apresentou o melhor resultado em relação à integridade do RNA molde (Fig. 8). Posteriormente, as reações de transcrição reversa e de PCR foram otimizadas utilizando-se quantidades padrão de RNA total e cDNA nas reações de amplificação. Este protocolo foi utilizado no levantamento que será apresentado no Capítulo III deste trabalho.

Apesar da sensibilidade da RT-PCR para detectar o complexo viral do alho, um teste adicional à análise dos produtos em gel de agarose foi empregado, visando aumentar a sensibilidade da visualização dos produtos da RT-PCR. Assim, seis produtos de PCR espécie-específico foram preparados em diluições seriadas e visualizados, comparativamente, em gel de agarose e por Hibridização em “Dot Blot” com as sondas moleculares espécie-específica produzidas neste trabalho (Fig. 6). Através do “Dot Blot” foi possível visualizar produtos de PCR em uma diluição de até 1:50, enquanto em gel de agarose a maioria dos produtos foram visualizados na diluição de 1:5. Desse modo, a hibridização em “Dot Blot” aumentou em 10 vezes a sensibilidade de visualização dos produtos de PCR amplificados. Como técnica de diagnose, a RT-PCR vem suplantando todas as outras técnicas devido a sua sensibilidade (Lunello *et al.*, 2004; Lunello *et al.*, 2005),

principalmente na indexação de plantas de alho provenientes de cultura de tecidos (Shiboleth *et al.*, 2000). Além disso, destaca-se a capacidade de detecção específica das espécies virais que formam o complexo do alho. Além disso, a capacidade de detecção das amostras, principalmente em baixas concentrações pode ser aumentada com o uso combinado de PCR e hibridização com sondas conforme demonstrado neste trabalho para os vírus GarCLV e o GarV-D.

Devido ao aumento da sensibilidade de detecção dos produtos amplificados pela RT-PCR, uma possibilidade é que a técnica de Hibridização em “Dot Blot” com as sondas moleculares não-radioativas espécie-específica seja utilizada conjuntamente a técnica de RT-PCR. A aplicação combinada das duas técnicas de detecção poderá ser uma opção efetiva para aumentar a eficiência de um sistema de indexação. A combinação de técnicas de diagnose, como DAS-Elisa e RT-PCR (Lunello *et al.*, 2005) combina a rapidez e a eficiência da sorologia em um primeiro teste, eliminando-se as amostras positivas, com a maior sensibilidade do RT-PCR nas amostras negativas na sorologia. Com isso, o número de reações de PCR pode ser diminuído, viabilizando sua aplicação em um sistema de indexação em larga escala.

A análise comparativa das técnicas NCM-Elisa e RT-PCR revelou uma possível reação cruzada entre os antissoros utilizados. A detecção por NCM-Elisa com antissoros produzidos contra OYDV, LYSV e um antissoro polivalente, revelou a presença dos vírus OYDV e LYSV tanto nas amostras da cv. Cateto Roxo (+) como Amaranite (Tab. 6). Entretanto, na detecção específica por RT-PCR nestas duas amostras somente a

presença de OYDV foi observada (Tab. 7). Baseada na sensibilidade diferencial entre a sorologia e a amplificação por PCR, provavelmente, a detecção de LYSV nas amostras por Elisa está relacionada à reação cruzada dos antissoros testados. Em antissoros policlonais, são produzidos anticorpos para todos os epitopos da capa protéica, incluindo os que possuem domínios altamente conservados no genoma dos *Potyvirus* (Lunello *et al*, 2005). Nas reações de PCR, por serem utilizados primers espécie-específicos, a possibilidade de detecção heteróloga é reduzida.

A RT-PCR foi sensível na detecção dos vírus do complexo viral em plantas matrizes provenientes de limpeza clonal. Esse resultado indica que a cultura de tecidos pode não ter sido eficiente para eliminar o GarCLV, o GarV-D e o GarMbFV e as plantas obtidas, não detectado pelo sistema de indexação atualmente em uso. Apesar da proteção contra insetos vetores nas condições controladas de multiplicação, também não pode ser descartada uma possível reinfecção das plantas ocorrida durante a multiplicação nos telados.

CAPÍTULO III: OCORRÊNCIA E PREVALÊNCIA DE ESPÉCIES VIRAIS NO COMPLEXO VIRAL DO ALHO (*Allium sativum*) EM QUATRO REGIÕES PRODUTORAS DE ALHO NO BRASIL

I. INTRODUÇÃO

O alho (*Allium sativum*) é uma hortaliça de origem asiática, da família *Alliaceae* e se destaca no mundo devido às suas características organolépticas e fitoterápicas (Yoshida *et al.*, 1987; Ress *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1997; Bianchi *et al.*, 1997; O’Gara *et al.*, 2000).

No Brasil, o alho é cultivado em diferentes regiões geográficas do país, com exceção da norte. Dois tipos de alho são comercializados. O **Alho Comum**, que é menos exigente em frio e fotoperíodo para bulbificação, é plantado nas regiões Nordeste e Central do Brasil. Além disso, produz bulbos com muitos bulbilhos e pequenos, de menor valor comercial. O **Alho Nobre**, que é mais exigente em frio e fotoperíodo para bulbificação, é plantado na região Sul do Brasil, na qual há condições favoráveis ao seu plantio, e na região Central do país, onde há necessidade de submetê-lo à técnica de vernalização para indução da bulbificação. Este tipo de alho produz bulbos com poucos bulbilhos grandes, com alto valor comercial.

São identificados, basicamente, quatro sistemas produtivos de alho no Brasil, considerando-se os dois grupos de alho anteriormente descritos:

- 1) Alho Comum (AC): cultivado majoritariamente nas regiões mais quentes do país como Centro-Oeste e Nordeste, em pequenas propriedades rurais, com o predomínio de baixo nível de tecnificação.

Neste sistema são plantados alho de duas categorias: o alho comum tradicional (ACt), o alho comum livre de vírus (ACLV);

2) Alho nobre sem vernalização (ANSVPP): cultivado por pequenos produtores no na região Sul;

3) Alho Nobre Vernalizado em Pequenos Produtores (ANVPP), cultivado em regiões de latitude mais baixa, como na Chapada Diamantina na Bahia, com predomínio de alto nível de tecnificação, tem sido inserido em áreas de produção da Bahia e Minas Gerais, onde predomina o sistema de cultivo de alho comum.

4) Alho Nobre Vernalizado em Grandes Produtores (ANVGP), cultivado no Cerrado brasileiro em grandes propriedades com predomínio de plantio das sementes de alho nobre submetidas ao sistema de vernalização.

Alguns produtores adotam sistemas mistos, das categorias descritas em 1 e 3, o que representa um aumento na tecnificação para os pequenos produtores de alho comum e uma alternativa de mercado para os pequenos produtores de alho nobre vernalizado.

Ecogeograficamente, o bioma cerrado (Distrito Federal, Goiás, Bahia e Minas Gerais) responde por mais de 50% da produção nacional de alho nobre, suplantando as regiões de clima frio do sul do país (40%) (IBGE, 2009). O Brasil consome 215.000 t de alho anualmente. Tradicionalmente, o país é o maior importador de alho do mundo, com um montante de 145.811 t anuais (Sistema Alice Web, 2009), apesar de dispor de todas as condições de clima, solo, mão-de-obra e tecnologia para ser autossuficiente e até se tornar exportador do produto. Entretanto, a expansão do crescimento se limita a alguns entraves nas barreiras

comerciais, aliados aos problemas fitossanitários, considerados graves para o setor.

A forma de propagação vegetativa da cultura é um facilitador na transmissão de várias espécies de vírus ao longo dos ciclos de plantio. O alho-semente utilizado pela maioria dos alhicultores no Brasil normalmente se encontra infectado por alguma espécie viral, o que conduz à elevação do título viral em cultivos sucessivos, causando uma redução em peso de bulbos de até 60% (Tanabe, 1999; Fajardo, 1998; Melo Filho *et al.*, 2006).

Há mais de 12 espécies virais infectando a cultura do alho (Tab. 3), com sete espécies descritas no Brasil (Fajardo *et al.*, 2001; Melo Filho *et al.*, 2006; Mituti, 2009). As infecções ocorrem de forma crônica, em sua maioria, por um complexo formado por mais de uma espécie. Os maiores causadores de prejuízos em alho são os vírus do gênero *Potyvirus*, sendo que as perdas são mais acentuadas quando alguma espécie de outro gênero, como *Carlavirus* ou *Allexivirus*, está também presente na infecção (Paludan, 1980 citado por Dovas *et al.*, 2001; Takaichi *et al.*, 2000).

Os levantamentos nacionais para a detecção das espécies do complexo viral do alho, realizados desde a década de 70, tiveram ampla abrangência territorial (Daniels, 1978; Assis *et al.*, 1995; Dusi, 1995). Entretanto, na época em que a maior parte dos estudos foi realizada, a identificação das espécies que infectavam a cultura do alho foi superficial devido à ausência de informações taxonômicas das espécies. O avanço das técnicas moleculares tornou possível a realização de um

levantamento sistematizado da distribuição das espécies já identificadas no Brasil em nível nacional, por região produtora.

Logo, o objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento de seis espécies do complexo viral do alho (*Onion yellow dwarf virus*- OYDV; *Leek yellow stripe virus*- LYSV; *Garlic common latent virus*- GarCLV; *Garlic virus C*- GarV-C; *Garlic virus D*- GarV-D; *Garlic mite-borne filamentous virus*- GarMbFV), nas principais regiões produtoras de alho no país (Centro-oeste, Sudeste, Sul e Nordeste), utilizando a técnica de RT-PCR, a fim de verificar a ocorrência e a prevalência das populações virais no território nacional de acordo com os sistemas produtivos utilizados para o plantio do alho. O *Shallot latent virus* (SLV) não foi incluído neste levantamento, pois o relato de sua ocorrência no Brasil foi posterior à realização deste levantamento. Para tal, ocorrência foi definida como a presença de uma doença, sem levar em consideração a incidência ou prevalência, e prevalência, a proporção entre o número de amostras infectadas e o número de amostras totais em um determinado momento e região (Preston, 2007).

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostragem

Amostras de alho provenientes de quatro regiões brasileiras foram solicitadas aos produtores rurais por intermédio do pesquisador Dr. André Nepomuceno Dusi, da Embrapa Hortaliças. Produtores dos Estados de Goiás, Bahia, Rio Grande do Sul e Minas Gerais foram contactados. As amostras foram identificadas por sistema produtivo, área geográfica, propriedade ou proprietário e cultivar (Tab. 8). Foram recebidos 352 bulbos de alho, provenientes de 37 propriedades em quatro regiões de produção, distribuídos por quatro sistemas de cultivo (AC, ASVPP, ANVPP, ANVGP).

Foram obtidas amostras de alho da Embrapa Hortaliças, no Distrito Federal, oriundas do programa de produção de alho semente livre de vírus, produzidas em telados e previamente indexadas por microscopia eletrônica e sorologia para serem utilizadas como controle não infectado.

Os bulbos de cada lote foram debulhados e 10% dos bulbilhos foram coletados ao acaso foram plantados em bandejas de poliestireno com substrato Plantimax®, em casa de vegetação, na Estação Experimental da Universidade de Brasília. As plantas foram submetidas a um turno de rega de duas vezes ao dia, pulverizadas semanalmente e alternadamente com acaricida e/ou inseticida. Logo após a emergência, as plantas foram transplantadas individualmente para vasos individualizados de 1 L contendo substrato composto de: uma parte de solo orgânico, uma parte de casca de arroz carbonizada, uma parte de esterco de gado curtido, 0,3 partes de calcário e 0,1 parte de fertilizante composto NPK 4-14-8. A mistura foi autoclavada por 4 h a 100°C antes do

uso. Dez dias após o transplante, coletou-se o terço médio das folhas mais desenvolvidas de cada planta. As amostras coletadas foram acondicionadas, individualmente, em papel alumínio e imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido. Em seguida, foram transportadas para o Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB e armazenadas em freezer a -80°C.

2. Metodologia de detecção do complexo viral do alho nas amostras

A extração de RNA total, a síntese do cDNA, a reação de RT-PCR e o teste de integridade do RNA total utilizados para a detecção das seis espécies do complexo viral nas amostras de folhas de alho estão detalhadas no capítulo II do presente trabalho nas páginas 37 a 40.

Tab. 8: Descrição das amostras de alho (*Allium sativum* L.) analisadas no Brasil, quanto à origem geográfica, o sistema produtivo e a cultivar.

Município-Estado	Sistema Produtivo	Propriedade/ Proprietário	Cultivar	Código
Cristalina-GO		Faz. Rio Preto	Ito	GO1
Cristalina-GO		Faz. Santa Bárbara	Chonan	GO2
Cristalina-GO		Faz. Lírio	Ito	GO3
Cristalina-GO	ANVGP	Faz. Rio Preto	Caçador	GO4
Cristalina-GO		Faz. Lírio	Jonas	GO5
Cristalina-GO		Faz. Lírio	Quitéria	GO6
Cristalina-GO		Faz. Lírio	Caçador	GO7
Cristalina-GO		Faz. Lírio	Chonan	GO8
Boninal-BA	ACLV	Comunidade do CEO	Cateto Roxo	BA26
Oliveira dos Brejinhos-BA	ACLV	Faz. Boa Esperança	Cateto Roxo	BA28
Cristópolis-BA	ACLV	Cerquinha	Cateto Roxo	BA29
Cristópolis-BA	ACT	Sítio Hermenegildo	Cateto Roxo	BA30
Caatinga do Moura/Jacobina-BA	ACLV	Faz. Boa Vista	Amarante	BA12
Caatinga do Moura/Jacobina-BA	ANVPP	Faz. Olhos D'Água	Caçador	BA14
Taquarendi/Mirangaba-BA	ANVPP	Faz. Canavieira	Caçador	BA27
Taquarendi/Mirangaba-BA	ACLV	Faz. Canavieira	Cateto Roxo	BA31
Taquarendi/Mirangaba-BA	ANV	Faz. Mandacaru	Caçador	BA09
Taquarendi/Mirangaba-BA	ACLV	Faz. Mandacaru	Amarante	BA10
Taquarendi/Mirangaba-BA	ACLV	Faz. Caetano	Cateto Roxo	BA11
Taquarendi/Mirangaba-BA	ACLV	Faz. Mandacaru	Amarante	BA13
Taquarendi/Mirangaba-BA	ACLV	Faz. Mandacaru	Amarante	BA25
Flores da Cunha-RS	ASVPP	Prop. Agenor	NI	RS15
Flores da Cunha-RS	ASVPP	Prop. Marcelo	Quitéria	RS16
Flores da Cunha-RS	ASVPP	Prop. Rafael Carlin	Chonan	RS17
Flores da Cunha-RS	ASVPP	Prop. Orildo	Caçador	RS18
Flores da Cunha-RS	ACLV	Prop. Márcio Slavieiro	NI	RS20
Francisco Sá-MG	ACT	Faz. Traçadal	Cateto Roxo	MG21
Francisco Sá-MG	ACLV	Faz. Gameleira	Cateto Roxo(Telado)	MG22
Francisco Sá-MG	ACLV	Faz. Tábuas	Cateto Roxo	MG19
Francisco Sá-MG	ACLV	Faz. Gameleira	Cateto Roxo(Campo)	MG23
Francisco Sá-MG	ANVPP	Emater	Caçador	MG24
São Gotardo-MG	ANVGP	Sekita Agronegócios	Ito Sul	MG35
São Gotardo-MG	ANVGP	Sekita Agronegócios	Ito Supremo	MG36
São Gotardo-MG	ANVGP	Suguiana	Ito Supremo	MG37
São Gotardo-MG	ANVGP	Sekita Agronegócios	Ito	MG38
São Gotardo-MG	ANVGP	Jorge Fukuda	São Valentino	MG39
São Gotardo-MG	ANVGP	Jorge Fukuda	Ito	MG40

Legenda: Fazenda (Faz.). Proprietário (Prop.). Não informado (NI). Alho nobre vernalizado grande produtor (ANVGP). Alho nobre vernalizado pequeno produtor (ANVPP). Alho nobre sem vernalização pequeno produtor (ASVPP). Alho comum livre de vírus (ACLV). Alho comum tradicional (ACT).

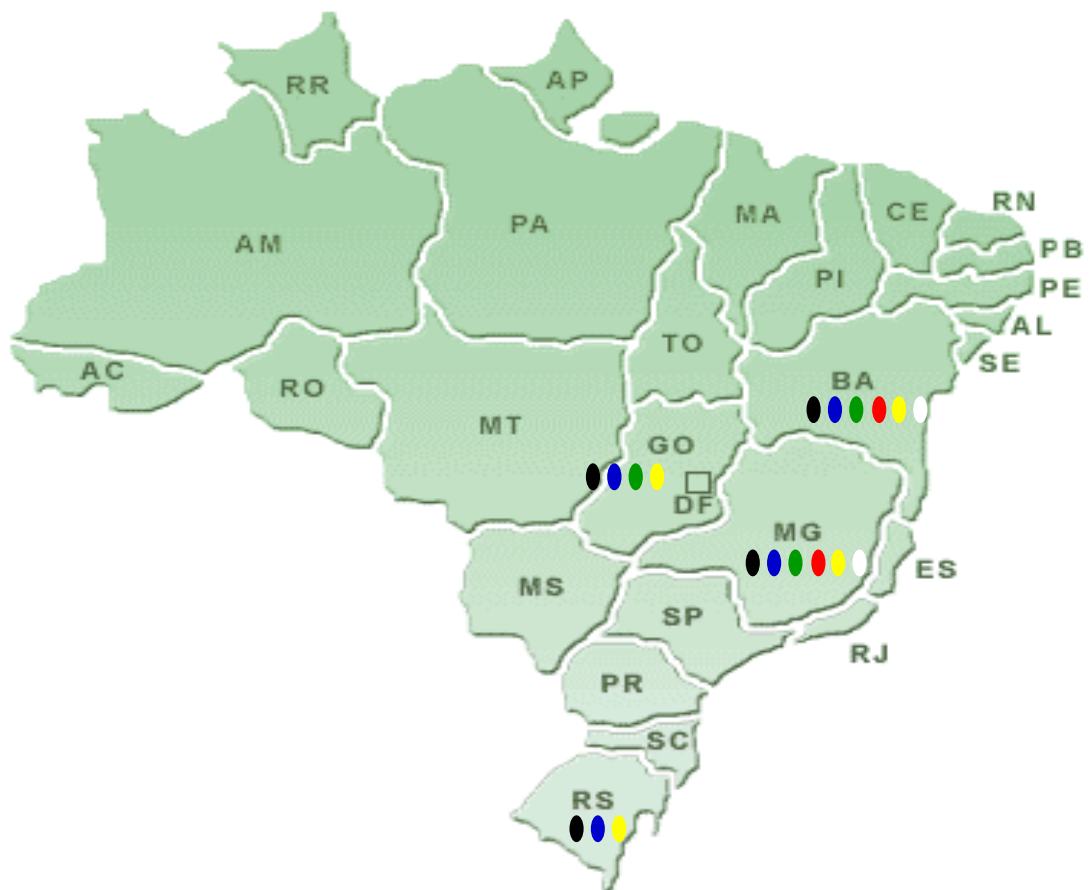
III. RESULTADOS

A tabela detalhada dos dados coletados no presente trabalho encontra-se disponível no Anexo, Tab. 1.

1. Ocorrência das espécies do complexo viral em quatro áreas produtoras de alho no Brasil

Em todas as regiões analisadas, foi detectada a presença de pelo menos três espécies virais. Nos estados de MG e BA, as seis espécies estão presentes; na região Sul e em GO, apenas três: dois *Potyvirus* e um *Allexivirus* (Fig. 9); e, em GO, há representantes dos três gêneros, sem ocorrência de todas as espécies (Fig. 10).

Os *Potyvirus* encontram-se dispersos nas cinco regiões. O único *Carlavirus* detectado até o momento no Brasil, o GCLV, foi observado nas amostras colhidas em GO, MG e BA. Em todas as regiões foi observada, no mínimo, uma espécie de *Allexivirus*. O GarV-C está distribuído em todas as regiões. Já o Garv-D e o GarMbFV encontram-se dispersos nas regiões de plantio que correspondem a área de cerrado (Fig. 10).



- *Onion yellow dwarf virus*
- *Leek yellow stripe virus*
- *Garlic common latent virus*
- *Garlic miteborne filamentous virus*
- *Garlic virus C*
- *Garlic virus D*

Fig. 10. Dispersão das espécies do complexo viral em cinco regiões produtoras de alho no Brasil.

2. Prevalência das espécies do complexo viral do alho por sistema produtivo e áreas produtoras, no Brasil

Na tab. 9 são apresentados os dados de prevalência, das seis espécies virais detectadas por sistema produtivo em diferentes áreas de produção de alho, no Brasil. De um modo geral, os *Potyvirus* foram prevalentes nos quatro sistemas produtivos utilizados no Brasil. Entretanto, o LYSV apresentou uma prevalência superior ao OYDV, que variou de 0 a 100% entre os municípios amostrados. O *Carlavirus* foi menos prevalente que os *Potyvirus* e os *Allexivirus*, na maior parte das análises, independente do sistema produtivo. Os *Allexivirus* foram detectados em todos os sistemas produtivos e o GarV-C foi o mais prevalente. Entretanto, a sua maior prevalência foi observada no sistema produtivo de ACt (47%), e o mesmo ocorreu para o GarMbFV (50%). O GarV-D foi detectado somente no sistema de ACLV, com a segunda menor prevalência (9%).

No sistema de ANVGP, mais precisamente no município de Cristalina (GO), o LYSV prevaleceu sobre todos os outros vírus e foi detectado em quatro das oito propriedades amostradas (Anexo, Tab. 1). Já no município de São Gotardo (MG), com o mesmo sistema de cultivo, somente três espécies foram detectadas e com taxas de prevalência inferiores aos outros sistemas. No sistema de ASVPP foram detectadas quatro espécies virais, entretanto houve o predomínio do LYSV (30%), seguido pelo GarV-C (22%). O GarV-D e GarMbFV não foram observados nas amostras analisadas desse sistema. O sistema de ANVPP apresentou altas taxas de prevalência de LYSV ($\geq 60\%$), este foi

detectado em todas as amostras, em duas delas a prevalência do mesmo foi de 100%. Metade das amostras apresentaram infecção múltipla, com o OYDV e GarV-C ou GarCLV, sempre com predomínio de LYSV. O GarV-D e o GarMbFV não foram detectados nas amostras deste tipo de sistema. No sistema de ACLV observou-se menor predomínio dos *Potyvirus*, em relação aos outros sistemas. Das 13 amostras analisadas nesse sistema, em seis delas, nenhum *Potyvirus* foi detectado, em contrapartida, nas amostras BA11 e BA13, apenas os *Potyvirus* foram detectados, com prevalência igual ou superior a 29%. O *Carlavirus* foi detectado em apenas duas amostras com baixa prevalência ($\leq 8\%$). Pelo menos um *Allexivirus* foi detectado em sete das treze amostras. Nas amostras BA31 e MG29, todos os *Allexivirus* foram detectados e com prevalência superior a 20%. Em três amostras (BA12, MG19 e MG23) observou-se infecção múltipla de *Potyvirus* com outro grupo de vírus. A amostra BA29 apresentou infecção simples e com baixa prevalência (20%). No sistema de ACt todas as espécies virais foram detectadas, com exceção do GarV-D. O LYSV e o GarMbFV foram detectados nas duas amostras analisadas neste sistema, sendo que as taxas de prevalência foram superiores a 47%. Nas amostras BA39 e MG21 prevaleceram o GarV-C e o OYDV, respectivamente, com taxas de 93 e 100%.

Nas áreas produtoras, no Estado da Bahia, (Tab. 9), no município de Caatinga do Moura/Jacobina o LYSV predominou, com prevalência superior a 90%. O OYDV variou conforme o sistema produtivo utilizado. Em Boninal, os *Potyvirus* prevaleceram com 63%, seguidos pelo GarCLV

com 12%. Na localidade de Oliveira dos Brejinhos apenas dois vírus foram detectados, sendo que o GarV-C foi o mais prevalente (58%). Em Cristópolis, na amostra BA29 proveniente do sistema produtivo do tipo ACLV somente o OYDV foi detectado e com baixa prevalência (20%). Em contrapartida, na amostra BA30 foram detectados o LYSV, o GarV-C e o GarMbFV com prevalência superior a 50%. No município de Taquarendi/Mirangaba amostras provenientes de dois sistemas produtivos foram analisadas. No sistema ACLV de cinco amostras, quatro apresentaram prevalência do complexo viral inferior a 29%. Com exceção da amostra BA31 que apresentou predomínio de *Allxivirus*, com prevalência superior a 40%. Entretanto, no sistema de ANVPP foram observadas prevalências superiores a 50%, com destaque para o LYSV, que prevaleceu em 100%, na amostra BA27.

Na região de Minas Gerais (Tab. 9), em São Gotardo, cujo sistema é o ANVGP, foram detectadas três espécies virais, porém com baixas prevalências, sendo o LYSV a espécie predominante (16%). No município de Francisco Sá, os *Potyvirus* predominaram, com prevalência de 100% nas amostras MG24 e MG21, cujo sistema de produção foi o ANVPP e o ACt, respectivamente. O GarCLV foi detectado em uma amostra das cinco analisadas. Pelo menos um *Allxivirus* foi observado no município Francisco de Sá, por sistema de produção, com exceção do ANVPP. O GarV-C e o GarMbFV prevaleceram sobre o GarV-D. Flores da Cunha (RS) (Tab. 9), a maior prevalência viral obtida foi para o LYSV (superior a 30%). O GarCLV com prevalência inferior a 10%. Pelo menos um *Allxivirus* foi observado nas amostras deste município.

Considerando o sistema de produção do alho no Brasil, de um modo geral, o LYSV prevaleceu em todos os sistemas de produção, com taxas de prevalência igual ou superior a 30% das amostras de cada município e em todos os sistemas de produção, com exceção do sistema de ACLV (Tab. 9). Na maioria das vezes, o OYDV apresentou prevalência inferior ao LYSV, entretanto no sistema ACLV, em Boninal (BA) a taxa de prevalência para o OYDV e o LYSV foi igual (63%). O GarCLV apresentou prevalência variando de 1 a 23%, sendo a menor taxa no sistema produtivo de ACLV. Os *Allexivirus* foram mais prevalentes nas amostras do sistema de ACt que nos demais sistemas produtivos (Tab. 9).

Tab. 9. Prevalência das espécies do complexo viral do alho (*Allium sativum*) por sistema produtivo.

Sistema Produtivo	Área de Produção	Município	Prevalência Viral (%)					
			OYDV	LYSV	GCLV	GarV-C	GarV-D	GarMbFV
ANVGP	GO	Cristalina	7	46	7	13	0	10
ANVGP	MG	São Gotardo	2	16	0	0	0	2
ASVPP	RS	Flores da Cunha	3	30	5	22	0	0
ANVPP	BA	Caatinga Moura/Jacobina-BA14	0	90	0	0	0	0
ANVPP	BA	Taquarendi/ Mirangaba-BA09	50	60	0	60	0	0
ANVPP	MG	Francisco Sá-MG24	0	100	0	0	0	0
ANVPP	BA	Taquarendi/ Mirangaba-BA27	0	100	50	0	0	0
ACLV	BA	Boninal	63	63	12	0	0	0
ACLV	BA	Oliveira dos Brejinhos-BA28	0	0	8	58	0	0
ACLV	BA	Cristópolis-BA29	20	0	0	0	0	0
ACLV	BA	Caatinga Moura/Jacobina-BA12	50	100	0	0	50	0
ACLV	BA	Taquarendi/ Mirangaba-BA11	20	10	0	0	0	0
ACLV	BA	Taquarendi/ Mirangaba-BA13	14	29	0	0	0	0
ACLV	BA	Taquarendi/ Mirangaba-BA31	0	0	0	90	40	50
ACLV	BA	Taquarendi/ Mirangaba-BA10	0	0	0	0	0	20
ACLV	BA	Taquarendi/ Mirangaba-BA25	0	0	0	22	0	11
ACLV	MG	Francisco Sá-MG22	0	0	0	57	0	43
ACLV	MG	Francisco Sá-MG19	0	60	0	50	20	30
ACLV	MG	Francisco Sá-MG23	27	18	0	9	0	55
ACt	BA	Cristópolis-BA30	0	80	0	93	0	53
ACt	MG	Francisco Sá-MG21	100	47	47	0	0	47

Alho nobre vernalizado grande produtor (ANVGP). Alho nobre vernalizado pequeno produtor (ANVPP). Alho nobre sem vernalização pequeno produtor (ASVPP). Alho comum livre de vírus (ACLV). Alho comum tradicional (ACt). Total: número de amostras infectadas/número de amostras total por sistema produtivo. *Onion yellow dwarf virus* (OYDV). *Leek yellow stripe virus* (LYSV). *Garlic common latent virus* (GarCLV). *Garlic virus C* (GarV-C). *Garlic virus D* (GarV-D). *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV).

3. Prevalência das espécies do complexo viral do alho por cultivar

Dentre os *Potyvirus*, o LYSV prevaleceu em proporções superiores ao OYDV, para todas às cultivares, independente do sistema produtivo utilizado (Tab. 10). O LYSV predominou nas cvs. Caçador e Jonas com prevalência igual ou superior a 50% (Tab. 10). O OYDV prevaleceu proveniente do sistema de AC/ACt (Tab. 10). O GarCLV ocorreu em cinco cultivares com baixas taxas de prevalência (Tab. 10) em relação aos demais gêneros. De um modo geral, os *Allexivirus* apresentaram maior prevalência nas cultivares de alho comum (Tab. 10). O GarV-C e GarMbFV predominaram na cv. Cateto Roxo e o GarV-D predominou na cv. Amarante, ambas cultivares de alho comum (Tab. 10). A cv. Cateto Roxo proveniente do sistema produtivo AC/ACLV foi à única infectada pelas seis espécies virais (Tab. 10).

As cvs. Amarante, Caçador, Chonan, Ito, Jonas e Quitéria foram infectadas por pelo menos dois vírus e nestas prevaleceu o LYSV, com destaque para a cv. Caçador que apresentou a maior prevalência de LYSV. As cvs. Jonas e Quitéria não foram infectadas por *Allexivirus* e a São Valentino não foi infectada por nenhuma espécie (Tab. 10).

Tab. 10. Prevalência do complexo viral do alho (*Allium sativum*) por cultivar de alho comum e nobre por sistema de produção utilizado no Brasil.

Cultivar	Sistema Produtivo	Prevalência Viral (%)					
		OYDV	LYSV	GCLV	GarV-C	GarV-D	GarMbFV
Amarante	ACLV	17	34	0	7	14	7
Cateto Roxo	ACLV	13	17	3	36	8	23
Cateto Roxo	ACt	50	63	23	47	0	50
Caçador	ANVPP	13	87	10	15	0	0
Caçador	ANVGP	7	52	0	0	0	11
Caçador	ASVPP	14	86	0	86	0	0
Chonan	ANVGP	0	68	0	8	0	8
Chonan	ASVPP	0	29	29	14	0	0
Quitéria	ANVGP	6	38	19	0	0	0
Quitéria	ASVPP	0	29	0	0	0	0
Jonas	ANVGP	0	50	17	0	0	0
São Valentino	ANVGP	0	0	0	0	0	0

Alho nobre vernalizado grande produtor (ANVGP). Alho nobre vernalizado pequeno produtor (ANVPP). Alho nobre sem vernalização (ANSV). Alho comum (AC). Alho comum livre de vírus (ACLV). Alho nobre vernalizado (ANV). Alho comum tradicional (ACt). *Onion yellow dwarf virus* (OYDV). *Leek yellow stripe virus* (LYSV). *Garlic common latent virus* (GarCLV). *Garlic virus C* (GarV-C). *Garlic virus D* (GarV-D). *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV).

IV. DISCUSSÃO

No Brasil, os *Potyvirus* encontram-se amplamente distribuídos por todas as regiões e municípios produtores avaliados, independente dos sistemas produtivos (Tab. 9) e da cultivar utilizada (Tab. 10), prevalecendo o LYSV, e não o OYDV, como informalmente se tem atribuído. Dados semelhantes foram obtidos no Japão, indicando a dispersão do LYSV em sete campos de produção, com uma frequência de 73 a 100%, enquanto a de OYDV variou de 0 a 40% (Takaichi *et al.*, 1998). Esses resultados diferem das análises realizadas em vários outros países do mundo nas quais o OYDV prevalece em relação ao LYSV (Barg *et al.*, 1994; Marys *et al.*, 1994; Lot *et al.*, 1998; Dovas *et al.*, 2001; Cafrune *et al.*, 2006; Shaareen *et al.*, 2008).

Entretanto, a maior prevalência de LYSV não indica, necessariamente, que os danos causados por ele sejam maiores do que os causados por OYDV. Lot *et al.* (1998) verificaram que o LYSV quando infectou isoladamente diferentes cultivares de alho causou uma redução no peso de bulbos da ordem de 17 a 28% para as cvs. Messidrome e Germidour e de 50 a 60% para a cv. Printanour. Já os resultados para infecção por OYDV foram contrários a LYSV, pois o peso de bulbos nas cvs. Messidrome e Germidour foi reduzido em até 65% e da cv. Germidour, 48%. Quando a redução no peso de bulbos foi avaliada em infecção mista (OYDV+LYSV), todas as cvs. foram severamente afetadas, com perdas variando de 56 a 84%. Supõe-se que perdas acentuadas estejam ocorrendo nos sistemas produtivos de ANVPP e ACt cuja prevalência de LYSV foi elevada, e nestas amostras foram detectadas

infecções mistas de *Potyvirus* e *Allexivirus* (Tab. 9; Anexo I, Tab. 1). O sistema de ANVPP vem sendo utilizado há alguns anos na Chapada Diamantina (Bahia) e está em fase de implementação em Francisco Sá (Minas Gerais). Neste município, o sistema predominante é o de ACT, mais rústico e desprovido de tecnificação mais intensa. Os produtores utilizam alho-semente de qualidade inferior aos demais sistemas. Isso pode acarretar um aumento da taxa de reinfecção do alho em campo, a cada ciclo da cultura. Como o plantio das sementes provenientes dos dois sistemas ocorre paralelamente, o nível de reinfecção das cultivares nobres é uma realidade, visto que no plantio de alho comum sistema tradicional, os baixos níveis de tecnificação utilizados sugerem altas taxas de inóculo inicial no material propagativo utilizado. Esta suspeita foi observada no presente trabalho, pois tanto no sistema de ACT, como no de ANVPP, o LYSV foi altamente prevalente, e nestas amostras também foram observadas a presença de infecções mistas, o que por efeito sinérgico podem acarretar aumento na intensidade dos danos causados pelo complexo viral (Taiwo *et al.*, 2007).

Os *Carlavirus* estão distribuídos em várias regiões de plantio de alho em todo o mundo, porém, não é endêmico (Barg *et al.*, 1994; Barg *et al.*, 1997). Isoladamente, a infecção por *Carlavirus* não causa sintomas severos nas plantas infectadas (Bellardi *et al.*, 1994). Entretanto, a ocorrência de infecções mistas de *Carlavirus* com os *Potyvirus* pode levar a um efeito sinérgico na sintomatologia de plantas de alho infectadas (Takaichi *et al.*, 1998). Verificou-se menores prevalência do GarCLV nos quatro sistemas produtivos em relação as outras espécies do complexo

(Tab. 9), porém nas amostras (G06, GO5, MG21, BA28 e BA27), onde o GarCLV foi detectado, observou-se a presença de pelo menos um *Potyvirus* ou um *Allexivirus* (Anexo, Tab. 1). A prevalência dos *Potyvirus* foi duas vezes superior à do GarCLV (Tab. 9). Esse fato pode ser explicado pela observação realizada por Van Dijk (1993), que relatou que os afídeos vetores são mais efetivos na transmissão dos *Potyvirus* que dos *Carlavirus*.

Os *Allexivirus* ocorreram, em sua maioria, em infecções múltiplas (Anexo, Tab. 1), com uma prevalência irregular variando de 0 a 93% (Tab. 9). O GarV-C foi detectado em todos os sistemas produtivos, sendo que, nas amostras dos sistemas ACLV e ACT foram observadas altas taxas de prevalência (Tab. 9). O GarV-D ocorreu em somente no sistema de ACLV (Tab. 9). O GarMbFV apresentou distribuição irregular entre os sistemas, porém foram nos sistema de alho comum suas maiores taxas de prevalência.

A irregularidade na distribuição dos *Allexivirus* também já foi identificada na Grécia (Dovas *et al.*, 2001). Entretanto, na Coréia do Sul, de todos os três gêneros do complexo viral, o *Allexivirus* foi o mais abundante, estando distribuído em todas as áreas de produção daquele país (Koo *et al.*, 2002). A irregularidade de distribuição dos *Allexivirus* pode estar relacionada à sua propagação durante o armazenamento dos bulbos, onde os ácaros encontram condições mais favoráveis para transmitir esses vírus do que em condições de campo (Lange e Mann, 1960). Entretanto, o armazenamento de modo adequado impede a ocorrência de ácaros e, conseqüentemente, a transmissão dos *Allexivirus*.

Dessa forma, se o produtor rural utilizar o próprio material de plantio como alho-semente (fato que ocorre com muita frequência), com um armazenamento inadequado, estará sujeito a uma alta taxa de infecção de *Allexivirus* no próximo plantio (Dovas *et al.*, 2001). Um outro fator, que pode corroborar com a dispersão desses vírus, principalmente no sistemas produtivo de ACLV seria a condição de multiplicação dos bulbilhos em telados antiafídicos, os quais favorecem a proliferação de ácaros, que são de difícil controle.

Os *Allexivirus* foram detectados, em sua maioria, em infecções múltiplas com *Potyvirus* e com outras espécies do mesmo gênero (Anexo, Tab. 1). Fato semelhante foi relatado por Koo *et al.* (2002), Takaichi *et al.* (1998), Takaichi *et al.* (2000), Lu *et al.* (2007) estes sugerem que a infecção múltipla dos *Allexivirus* podem aumentar os efeitos sintomatológicos e causar redução na produção.

Além da distribuição das espécies virais nas regiões de plantio, outro fator analisado foi a distribuição das espécies virais nas regiões produtoras de alho em relação à cultivar predominantemente plantada. Não podemos afirmar que determinada cultivar é ou não mais susceptível a uma determinada espécie viral, pois não foi realizado um rastreamento prévio da qualidade fitossanitária e da procedência do material que originou os bulbilhos analisados neste trabalho. A distribuição das espécies do complexo viral nas cultivares analisadas ocorreu de forma irregular nos diversos sistemas de produção. Na maioria delas, foi observada a presença de pelo menos uma espécie viral e, em alguns casos, com prevalência de até 87% (Tab. 10). Na cv. Cateto Roxo, por

exemplo, foi observada a presença de *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus* no sistema produtivo de ACLV, entretanto no sistema de ACt, espécies dos três gêneros foram detectadas porém com taxas de prevalências superiores ao alho cultivado em sistema de ACLV. A infecção no sistema de ACLV ocorre de forma natural à medida que o alho é exposto a campo, entretanto em taxas de re-infecção mais lentas, como comprova o trabalho de Melo Filho *et al.*, 2004. Em regiões onde predomina o alho comum, utiliza-se pouca tecnificação e normalmente o produtor seleciona os melhores bulbos da safra anterior, para serem plantados no ano seguinte, o que acarreta plantas de alho já infectadas e sujeitas a altas taxas de re-infecção e conseqüentemente, queda de produtividade e baixa qualidade fitossanitária do material propagativo.

As cultivares de alho nobre apresentaram menores taxas de infecção nas regiões cujo sistema produtivo é o ASVPP, onde níveis mais elevados de infecção foram observados do que no sistema de ANVGP (Tab. 10). Esse último sistema de produção utiliza um acentuado nível de tecnificação. Isso pode ser explicado pela qualidade fitossanitária da origem do alho-semente utilizado pelos produtores rurais. Informações pessoais dos produtores de Flores da Cunha (RS) revelaram que o alho-semente plantado na região foi adquirido de Farroupilha (RS) e é utilizado a mais de 10 anos em plantios sucessivos em campo. Em contrapartida, o alho nobre adquirido pelos produtores do sistema de ANVGP (Cristalina) procedem de Santa Catarina e, provavelmente, é multiplicado em campo por no máximo dois a três anos, o que sugere uma qualidade fitossanitária do alho por grandes produtores superior ao de Flores da

Cunha. Um destaque observado no sistema de ANVGP foi para as cultivares do município de São Gotardo (MG), que apresentaram baixos índices de prevalência viral, ou nenhum, como na cv. São Valentino. Esses resultados sugerem que o material fornecido para análise apresentava uma boa qualidade fitossanitária e sofreu uma reduzida taxa de reinfecção no campo. Por outro lado, no município de Francisco de Sá (MG), todas as espécies virais foram detectadas, dado o sistema de produção com baixa tecnificação adotado na região.

De um modo geral, os tipos de sistema de cultivo influenciam diretamente a qualidade do material propagativo. Nos sistemas de ANVGP e ASVPP, onde predominam a alta tecnificação foram observados menores prevalências virais. Já nos sistemas de ACt, ACLV e ANVPP predominaram a maioria das espécies virais (Tab. 9). Os sistema de ACt vem sendo substituído gradativamente pelos produtores rurais de foram a aumentar o nível de tecnificação, como a introdução do ACLV e ANVPP nas regiões de predominância de plantio de alho rústico. Porém, a transição de sistema produtivo ocorre de forma lenta e gradual e é necessário que os produtores de alho rústico se conscientizem da importância da sanidade do alho-semente plantado. Esse trabalho tem sido realizado pela por uma equipe da Embrapa Hortaliças há alguns anos e mudanças têm sido observadas, como no caso dos produtores de ACLV das amostras BA28, BA29 e BA13, onde se houve baixas taxas de prevalências virais.

Com os resultados obtidos foi possível a elaboração de um mapa da distribuição das espécies do complexo viral do alho por sistema

produtivo nas áreas produtoras de alho do Brasil. Essas regiões representam cerca de 76 % da produção nacional (Tab. 2, Cap I) e indicam que os estudos de danos causados pelos vírus devem ser iniciados por elas.

Novos levantamentos, envolvendo um maior número de amostras e sub-áreas de produção devem ser realizados com um delineamento mais adequado para permitir a determinação da incidência de cada espécie nas amostras. Esse monitoramento, associado a estudos de danos causados por cada espécie será de grande valia no delineamento de uma estratégia de indexação em larga escala em um programa de certificação de alho semente, essencial para melhorar a qualidade fitossanitária da cultura no país. Dessa forma, ações conjuntas com os diferentes atores do processo produtivo poderão ser desenvolvidas visando à diminuição dos prejuízos causados pelo complexo viral do alho nas regiões produtoras no Brasil.

CAPÍTULO IV: EFEITOS FISIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E CITOLÓGICOS EM PLANTAS DE ALHO (*Allium sativum* L.) CAUSADOS POR INFECÇÃO VIRAL.

I. INTRODUÇÃO

A infecção causada pelas espécies do complexo viral do alho acarreta danos e perdas na cultura do alho (Melo Filho et al., 2006). Isso acontece, provavelmente, em decorrência de alterações nos processos metabólicos e de desenvolvimento da planta. Os processos fisiológicos vitais de uma planta, podem ser resumidos nos seguintes: acúmulo de nutrientes em órgãos de armazenamento para o desenvolvimento de tecidos embrionários, desenvolvimento de tecidos jovens dependentes dos nutrientes armazenados, absorção de água e elementos minerais a partir de um substrato, transporte de água e elementos minerais através do sistema vascular, fotossíntese e utilização, pela planta, das substâncias elaboradas pela da fotossíntese (Taiz & Zaiger, 2009).

Uma vez estabelecida a compatibilidade do vírus com a planta hospedeira, o alho, o vírus passa a colonizar as células que compõem os diferentes tecidos da hospedeira e a comprometer a integridade do organismo infectado em todos os níveis. A princípio, ocorrem modificações fisiológicas e bioquímicas, através da ativação e/ou bloqueio de determinadas atividades celulares, como reduções na taxa fotossintética (Arias *et al.*, 2003; Sampol *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2005; Rowland *et al.*, 2005), na condutância estomática (Bertamini *et al.*, 2004), na quantidade de pigmentos, de carboidratos e de proteínas (Radwan *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2005; Bertamini, *et al.*, 2004;

Jadão *et al.*, 2004; Sampol *et al.*, 2003; Shalitim & Wolf, 2000; Rahoutei *et al.*, 2000). Em seguida, ocorrem alterações citológicas, à medida que o patógeno se replica nas células, como, por exemplo, alterações na estrutura e no número de cloroplastos e de grãos de amido, além de desordens estruturais internas de organelas (El-Ela *et al.*, 2006; Hull, 2002; Zechmann *et al.*, 2003). Ocorre uma verdadeira batalha metabólica e, nas plantas susceptíveis, os vírus passam a controlar parte do metabolismo da célula parasitada (Leite & Pascholati, 1995). Todo esse processo infeccioso resultará na queda de produtividade da cultura (Agrios, 2005), podendo reduzir drasticamente a produção de bulbos (Cafrune *et al.*, 2006; Melo Filho *et al.*, 2006).

Mesmo com a consolidação da biologia molecular poucos esforços têm sido direcionados para se compreender os efeitos da infecção viral na fisiologia da hospedeira (Arias *et al.*, 2003). Os estudos disponíveis voltados para a compreensão das alterações fisiológicas, bioquímicas e citológicas são comparativamente reduzidos às pesquisas realizadas sobre genômica e proteômica de vírus vegetais. Das infecções causadas pelos vírus do complexo viral do alho a maior parte dos estudos tem sido direcionados a análise de características moleculares e agronômicas, em vários países produtores de alho no mundo (Tanabe, 1999; Takaichi *et al.*, 2000; Shibolet *et al.*, 2000; Fajardo *et al.*, 2001; Cristostomos *et al.*, 2001; Conci *et al.*, 2003; Melo-Filho *et al.*, 2004 e 2006; Lu *et al.*, 2007). Os trabalhos de pesquisa visando estudar as modificações fisiológicas, bioquímicas e citológicas ocasionadas pelos vírus em plantas de alho são escassos e as informações científicas do efeito da infecção viral sobre

essas variáveis são praticamente inexistentes. Com base nas necessidades de informações, o presente trabalho teve como objetivos:

- a) Avaliar as alterações fisiológicas, morfológicas, bioquímicas e citológicas causadas pelo complexo viral do alho;
- b) Ampliar o conhecimento sobre os efeitos da infecção viral nas plantas hospedeira.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Instalação do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na Estação Experimental da Universidade de Brasília. Os bulbos de alho da cv. Cateto Roxo foram cedidos pela Embrapa Hortaliças, livres de vírus, provenientes de cultura de meristemas e termoterapia e previamente indexados para vírus. O alho infectado da mesma cultivar foi proveniente da coleção de germoplasma da Embrapa Hortaliças, mantido em campo em cultivos sucessivos e infectado naturalmente pelo complexo viral composto pelo menos por duas espécies virais (OYDV e LYSV). Dez bulbilhos de cada tratamento (sadia e infectada) foram semeados em bandejas de poliestireno e, aos 30 dias após o plantio (DAP), transplantados para vasos de 3 Kg, contendo uma mistura composta (terra, casca de arroz carbonizada, esterco de gado curtido, calcário dolomítico e adubo 4-14-8), preparada na Embrapa Hortaliças. Durante o experimento, foram realizadas adubações quinzenais de cobertura com o N-P-K na formulação 4-14-8. O turno de rega foi diário, aproximadamente 500 mL de água por planta. Pulverizações com acaricida sistêmico (Orthene[®] 750 BR) foram realizadas mensalmente e com de contato (Envidor[®]), quinzenalmente, conforme recomendação do fabricante. Para o controle de afídeos utilizou-se o inseticida Decis[®] 25 EC, em aplicações semanais também, conforme recomendações do fabricante.

Dois ensaios (lote I e lote II) foram montados simultaneamente. No lote I, avaliaram-se as variáveis de crescimento: altura de planta, massa fresca, massa seca, massa de bulbos e área foliar. No lote II, foram

avaliadas as variáveis fisiológicas e bioquímicas: assimilação máxima (A_{max}), taxa de transpiração (E), condutância estomática (g_s), açúcares solúveis totais, clorofila *a* e *b*, carotenóides, proteínas totais e atividade da Rubisco.

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados, com 2 tratamentos (plantas sadias e infectadas) e 10 repetições para cada época de avaliação (30, 60, 90 DAP). Os ensaios foram repetidos por três anos consecutivos (2007, 2008 e 2009) para cada lote.

As análises das amostras foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade de Brasília. Para as variáveis área foliar, massa fresca, massa seca, condutância estomática, atividade da Rubisco e açúcar solúvel total os dados foram transformados na base log. Todos os dados das foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de acordo com o modelo de blocos generalizados ao acaso com medidas repetidas no tempo. Em seguida, procedeu-se à comparação de médias pelo Teste de Tukey, por meio do programa SAS versão 8.0 (Cary NC, 1999) ao nível de 5% de probabilidade. com exceção dos dados de amido que não foram analisados estatisticamente.

2. Avaliação das variáveis de crescimento

A altura de cada planta foi com régua graduada, medindo-se a distância entre o colo da planta e a folha mais expandida. A massa fresca de parte aérea de cada indivíduo foi determinada imediatamente após o corte da planta em balança de precisão (Analytical[®] modelo: Standard) ($\pm 0,001$ g). A massa seca foi obtida após secagem em estufa a 70 °C por 72

h. As imagens das folhas de cada planta foram digitalizadas e suas áreas calculadas pelo programa AREA versão 2.1 (Caldas *et al.* 1992).

3. Avaliação das variáveis fisiológicas e bioquímicas

3.1. Medidas fotossintéticas

A capacidade fotossintética máxima (A_{max}), a condutância estomática (g_s) e a transpiração (E) foram avaliadas nas plantas provenientes do lote II em 3 a 5 folhas maduras, totalmente expandidas, através do aparelho IRGA LCpro da ADC BioScientific Ltd (Hoddesdon, Inglaterra). As taxas de condutância estomática e de transpiração foram determinadas apenas aos 60 e 90 DAP. A capacidade fotossintética máxima foi obtida acoplando-se ao aparelho uma fonte de fotodiodo (12v, 20w), com intensidade luminosa constante de $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, suficiente para saturar o aparato fotossintético e selecionada após testes de aclimação iniciais de plantas de alho. As medidas foram realizadas durante o período das 8:00 às 11:30 h da manhã, com o intuito de evitar os baixos valores de déficit de pressão de vapor de água no início da manhã e seus altos valores após o meio dia (Prado *et al.*, 2004). A temperatura do ar na câmara do aparelho foi a do ambiente que variou, entre 25 e 30 °C. Em cada medida, os valores de assimilação de CO_2 foram monitorados, em média, de 5 a 10 min até se estabilizarem. Para cada indivíduo foram realizadas cinco leituras com intervalo de 1 min cada. Os dados obtidos foram analisados conforme descrito no item 1.

3.2. Pigmentos fotossintéticos

As folhas utilizadas para a análise de pigmentos fotossintéticos foram coletadas dos mesmos indivíduos utilizados na análise da atividade fotossintética, sendo amostradas três folhas por indivíduo, as mais desenvolvidas, escolhidas ao acaso. Um disco de 0,63 cm² foi retirado do centro do limbo de cada folha, o qual foi colocado em um tubo de microcentrífuga (Eppendorf®) âmbar contendo 2 ml de DMF (N, N-dimetilformamida - HCON (CH₃)₂ – Fabricante: Vetec®). Os tubos foram imediatamente envolvidos em papel de alumínio e dispostos em caixas de isopor contendo gelo. Após a coleta, as amostras foram mantidas a 4°C por 24 h em geladeira. Ao término desse tempo foi determinada a absorvância das amostras nos comprimentos de onda de 663,8 nm, 646,8 nm e 480 nm, em espectrofotômetro (Thermo Spectronic® modelo Genesys 2), para determinação das clorofilas *a* e *b* e dos carotenóides totais, respectivamente. Com os valores de absorvância obtidos as concentrações de clorofila *a* e *b*, clorofila total (*a+b*) e carotenóides totais foram calculadas, segundo Wellburn (1994). Os dados obtidos foram analisados conforme item 1.

3.3. Análise de açúcares solúveis totais (AST)

Amostras de folhas de cada tratamento, nas três épocas de avaliação foram coletadas às 9:00 h, 11:00 h, 12:30 h, 14:30 h e 16:30 h, em um mesmo dia e imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido. Em seguida as amostras foram liofilizadas em aparelho MicroModulyo (ThermoSavant®), durante 48 h ou até a completa secagem do material e armazenadas em um dessecador. Apenas as amostras coletadas em

2007 foram analisadas aos 60 e 90 DAP. Foram analisadas 100 amostras (50 de plantas sadias e 50 de plantas infectadas) por avaliação.

A extração dos carboidratos solúveis foi realizada segundo o protocolo descrito por Bielek & Turner (1966) com modificações. Cinquenta miligramas de cada amostra liofilizada foi triturada em nitrogênio líquido. Os lipídios foram extraídos com 10 mL de éter dietílico. O material foi separado em centrífuga (Sorvall[®] modelo RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge, Rotor SE-12) a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. O material insolúvel foi submetido a duas extrações com 10 mL de MCW (metanol, clorofórmio e água na proporção 12:5:3 v/v) segundo adaptação do método de Shannon (1968). Após cada extração, o material insolúvel foi precipitado por centrifugação conforme descrito anteriormente. Os sobrenadantes foram combinados, obtendo-se um volume final de 20 mL para cada amostra (frações MCW). Às frações MCW foram adicionados 7,5 mL de água destilada e 5 mL de clorofórmio. Os funis foram agitados e as fases separadas durante a noite (Bielek e Turner, 1966). Obtiveram-se duas fases: a superior composta de metanol e água, contendo açúcares solúveis e a inferior, formada pelo clorofórmio, contendo lipídios e pigmentos. A fase superior com volume de 20 mL foi utilizada para dosagem de açúcares solúveis totais e a inferior foi descartada. A determinação dos carboidratos totais foi realizada de acordo com o método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) em duas réplicas para cada amostra. Aliquotas de 5 µL de cada extrato foram acrescidas de 495 µL de água destilada, 500 µL de solução de fenol (Vetec[®]) 90% e 2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄ - Vetec[®]) concentrado.

Após o resfriamento da reação a amostra foi agitada e procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Thermo Spectronic® modelo Genesys 2) a 490nm. As concentrações de açúcares solúveis foram calculadas a partir de uma curva-padrão obtida com leituras de soluções contendo 0, 5, 10, 20, 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de glicose. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística conforme o item 1.

3.4. Extração e dosagem de amido

A hidrólise e dosagem de amido foi realizada de acordo com o método enzimático (Amaral *et al.*, 2007). Foram utilizados 10 mg de amostras de folhas, bulbilhos ou raízes, coletadas aos 60 e 90 DAP no ano de 2007. Não foram coletadas amostras aos 30 DAP, pois neste fase de desenvolvimento a planta ainda não havia iniciado os processos de diferenciação e enchimento dos bulbos (Mann & Minges, 1958). Após a coleta, todo o material foi liofilizado por 48 h. Os açúcares solúveis totais e pigmentos das folhas foram extraídos com 500 μL de etanol 80% a 80 °C por 20 min, por quatro vezes, totalizando 2,0 mL. Após centrifugação, o sobrenadante, contendo açúcares e pigmentos foi descartado. Após secagem em temperatura ambiente por 24h, adicionou-se ao precipitado 0,5 mL de α -amilase termoestável ($120 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) do *Bacillus licheniformis* (MEGAZYME®) diluída em tampão ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico (MOPS) 10 mM pH 6,5. As amostras foram incubadas a 75 °C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido totalizando-se 1,0 mL de extrato. Após resfriamento até 50 °C, adicionou-se, a esse extrato, 0,5 mL de solução contendo amilogucosidade (AMG) ($15 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) do fungo *Aspergillus niger* (MEGAZYME®) em tampão acetato de sódio 10 mM pH

4,5. Este passo foi repetido, totalizando um volume de 2,0 mL de extrato. Ao extrato foram acrescentados 100 µL de ácido perclórico 0,8 M para parar a reação e precipitar as proteínas. Após uma rápida centrifugação em microcentrífuga (Eppendorf® modelo 5415 R), por 2 min a 10.000 rpm, procedeu-se à dosagem da glicose liberada em alíquotas de 100 µL de extrato, às quais foram adicionados 1,5 mL do reagente GODPOD - Glicose PAP Liquiform (CENTERLAB®) que contém as enzimas glucose-oxidase e peroxidase e os reagentes 4-aminoantipirina e fenol (Vetec®). Após incubação por 15 min a 37 °C, o teor de glicose foi determinado em espectrofotômetro (Thermo Spectronic® modelo Genesys 2) utilizando-se comprimento de onda 490nm. Uma curva padrão de glicose, nas concentrações de 0; 12,5; 25; 50 e 75 µg/µL foi utilizada para calcular a quantidade de glicose liberada após a hidrólise enzimática do amido. Os valores obtidos foram ajustados, a -10%, para a massa de glicose ligada que está presente no amido.

3.5. Extração e quantificação de proteínas totais

As amostras coletadas, nos três anos, foram imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido. Cento e cinquenta miligramas de cada amostra foram pesados e triturados em nitrogênio líquido. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão fosfato salino (PBS) (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂PO₄ 10 mM e KH₂PO₄ 2mM) pH 7,4. As amostras foram centrifugadas em microcentrífuga (Eppendorf® Modelo 5415 R) a 13.500 rpm por 10 min a 4 °C. Em seguida, as proteínas totais dos sobrenadantes das amostras foram quantificadas seguindo o protocolo de Bradford (1976). Para tanto, 10 µL de cada amostra foram adicionados a

790 µL de água destilada e 200 µL de solução do reagente de Bradford (Bio-Rad®) e realizou-se a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro (Thermo Spectronic® modelo Genesys 2). Uma curva padrão de solução de albumina de soro bovino (BSA) foi obtida, nas concentrações de 0, 1, 2, 4, 8 e 16 µg/µL. A equação originada da curva padrão foi utilizada para realizar o cálculo de proteína total. Os dados foram analisados estatisticamente conforme item 1.

3.6. Atividade da enzima Rubisco

O terço médio das folhas completamente expandidas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. A extração e quantificação da atividade da Rubisco foi processada segundo o protocolo de Paulino *et al.* (1995). Quinhentos miligramas do material foram pesados e triturados rapidamente em nitrogênio líquido. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, pH 7,6; Ácido etilenodiamino tetra-acético- EDTA 1,5 mM; MgCl₂ 1,5 mM, Dithiothreitol- DTT 5mM, glicerol 10% (v/v), Polivilpirrolidona- PVP (insolúvel) 10% (p/v); Tween 20 2,5% (v/v), PEG 20000 2% (p/v)). A solução foi homogeneizada e centrifugada a 15.000 rpm por 1 min a 4 °C (Eppendorf® Modelo 5415 R). Em seguida, coletou-se o sobrenadante e o volume total foi medido e uma alíquota foi imediatamente testada para a atividade enzimática, através de reação de oxidação do nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) acoplada à reação de incorporação de CO₂, com uma mistura contendo 100 mM Bicina – KOH, pH 8,0; 25 mM NaHCO₃, 20 mM MgCl₂, 3,5 mM Adenosina trifosfato- ATP; 3,5 mM P-creatina + BSA (0,1%); 0,25 mM NADH, 10 U creatina-P-quinase, 10 U

gliceraldeído-3-P-desidrogenase e 10 U fosfoquinase fosfoglicérica. O ensaio iniciou-se após a adição de 0,5 mM de Ribulose bifosfato. A atividade enzimática foi calculada baseando-se na lei de Lambert-Beer, a partir da oxidação do NADH, sendo realizadas leituras no espectrofotômetro (Thermo Spectronic® modelo Genesys 2) a 340 nm por aproximadamente 20 min com intervalo de 10 seg entre as leituras. Os dados foram analisados estatisticamente conforme descrito no item 1.

4. Avaliação citológica das células infectadas pelo complexo viral

Três repetições de amostras de folhas desenvolvidas de plantas de alho (60 DAP) sadias e infectadas por um complexo viral composto pelas espécies OYDV, LYSV, GarCLV e GarMbFV (Amostra MG21, analisada no Cap. III por RT-PCR) foram processadas e as características citológicas foram investigadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão conforme o protocolo adaptado de De Souza (1989). As amostras foram cortadas em pedaços de 1 a 2 mm² e fixadas em glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, sacarose 3% em tampão cacodilato de sódio (Caco) 0,05 M por 1 h em temperatura ambiente e 12 h em geladeira. Decorrido o período de fixação, o excesso dos reagentes foi removido com quatro lavagens seqüenciais em tampão Caco. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 2% e ferrocianeto de potássio 1,6% (1:1 v/ v) e incubadas em temperatura ambiente, por 1 h, no escuro. Os pós-fixadores foram retirados e o excesso foi eliminado com duas lavagens com o tampão Caco de 15 min cada e duas lavagens repetidas com água destilada, rapidamente. Em seguida, adicionou-se às amostras uma solução de acetato de uranila 0,5%. Essas foram incubadas por 2 h

no escuro após o qual o excesso do contrastante foi removido com três lavagens em água destilada por 30 seg. Posteriormente, os blocos foram desidratados em uma série de concentrações de acetona de 30% a 100% e, lentamente, incorporados com resina epóxi Spurr. Foram obtidos cortes semi-finos e ultra-finos em ultra-micrótomo com facas de vidro e diamante. Os materiais foram analisados sob microscopia ótica em um microscópio Zeiss[®] (modelo Axiophot) e por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) em um microscópio JEOL[®] (modelo JEM 1011), no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília.

III. RESULTADOS

1. Alterações nas variáveis de crescimento em plantas de alho sadias e infectadas pelo complexo viral

De acordo com o teste F, foram encontradas evidências de diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, entre os tratamentos, para as variáveis: área foliar (Tab. 11), altura (Tab. 12), massa seca (Tab. 13), massa fresca (Tab. 14).

Tab. 11. Análise de variância para a variável área foliar.

Fator	GL	SQ	QM	F	p
Sanidade	1	7,5036	7,5036	87,17	□ 0,0001
Ano	2	8,6088	4,3044	50,01	□ 0,0001
SanidadeXAno	2	0,2951	0,1475	1,71	0,1840
Época de Avaliação (ED)	2	30,1630	15,0815	175,21	□ 0,0001
SanidadeXED	2	1,0550	0,5275	6,13	0,0028
Erro	134	11,5344	0,0860		

CV: 6,57

Tab. 12. Análise de variância para a variável altura.

Fator	GL	SQ	QM	F	P
Sanidade	1	4854,83	4854,83	97,43	□ 0,0001
Ano	2	5125,70	2562,85	51,44	□ 0,0001
SanidadeXAno	2	431,97	215,98	4,33	0,0150
Época de Avaliação (ED)	2	6803,35	3401,67	68,27	□ 0,0001
SanidadeXED	2	85,07	42,54	0,85	0,4281
Erro	134	6676,81	49,82		

CV:16,09

Tab. 13. Análise de variância para a variável massa fresca.

Fator	GL	SQ	QM	F	P
Sanidade	1	14,59	14,59	117,04	□ 0,0001
Ano	2	28,48	14,24	114,18	□ 0,0001
SanidadeXAno	2	0,51	0,25	2,06	0,1321
Época de Avaliação (ED)	2	57,01	28,50	228,57	□ 0,0001
SanidadeXED	2	1,64	0,82	6,59	0,0019
Erro	134	16,71	0,124		

CV: 22,26

Tab. 14. Análise de variância para a variável massa seca.

Fator	GL	SQ	QM	F	P
Sanidade	1	0,0416	0,0416	12,78	0,0006
Ano	1	0,2978	0,2978	91,53	□ 0,0001
SanidadeXAno	1	0,0093	0,0093	2,87	0,0939
Época de Avaliação (ED)	2	0,3277	0,1638	50,36	□ 0,0001
SanidadeXED	2	0,0052	0,0026	0,80	0,4532
Erro	88	0,2863	0,0032		

CV: 2,38

As médias das variáveis de crescimento (Fig. 11), seguidas das mesmas letras na mesma reta não diferem estatisticamente e as médias seguidas das mesmas letras, porém em caixas diferentes (minúscula e maiúscula) diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

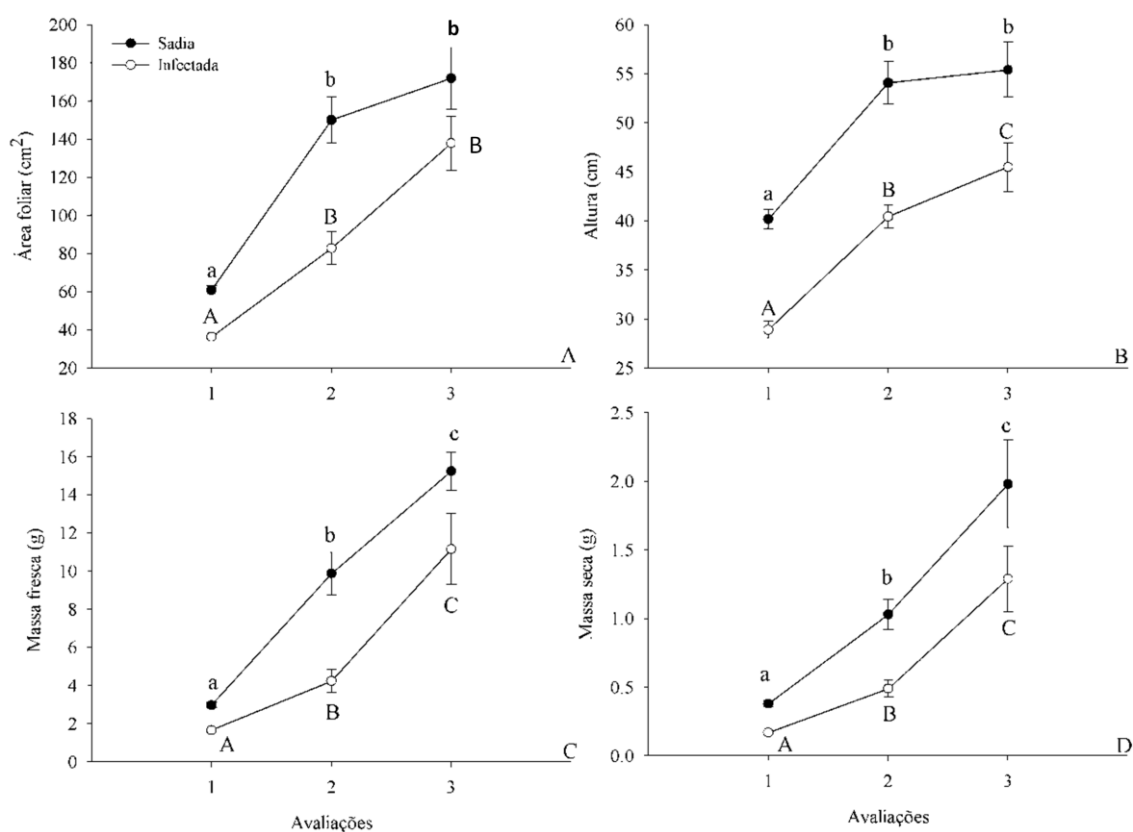


Fig. 11. Avaliação das variáveis de crescimento em plantas de alho (*Allium sativum*) sadias e infectadas pelo complexo viral em três épocas (30, 60 e 90 dias após o plantio) por três anos. Variáveis: Área foliar (A); Altura da planta (B); Massa fresca (C) e Massa seca (D). Os valores das médias obtidos (média de 3 anos) seguidas das mesmas letras na mesma reta não

diferem estatisticamente e as médias seguidas das mesmas letras, porém em caixas diferentes (minúscula e maiúscula) diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2. Alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas de alho sadias e infectadas pelo complexo viral

2.1. Variáveis Fotossintéticas

De acordo com o teste F, foram encontradas evidências de diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, entre os tratamentos, para a variável fotossíntese (Tab. 15). Porém para as variáveis: condutância estomática (Tab. 16) e evapotranspiração (Tab.17) não houve diferença entre os tratamentos.

Tab. 15. Análise de variância para a variável assimilação de CO₂.

Fator	GL	SQ	QM	F	P
Sanidade	1	81,57	81,57	9,07	□ 0,0001
Ano	2	302,84	151,41	16,84	□ 0,0001
SanidadeXAno	2	192,27	96,13	10,69	□ 0,0001
Época de Avaliação (ED)	2	70,46	35,22	3,92	0,0222
SanidadeXED	2	132,81	66,40	7,38	0,0009
Erro	134	1205,02	8,99		

CV: 22,9

Tab. 16. Análise de variância para a variável condutância estomática

Fator	GL	SQ	QM	F	P
Sanidade	1	0,0012	0,0012	0,23	0,6313
Ano	1	0,0026	0,0026	0,50	0,4808
SanidadeXAno	1	0,1496	0,1496	28,78	□ 0,0001
Época de Avaliação (ED)	1	0,0129	0,0129	2,49	0,1202
SanidadeXED	1	0,0061	0,0061	1,19	0,2804
Erro	58	0,3016	0,0052		

CV: 8,51

Tab. 17. Análise de variância para a variável evapotranspiração.

Fator	GL	SQ	QM	F	P
Sanidade	1	22,73	22,73	10,45	0,0016
Ano	2	9,25	4,62	2,13	0,1236
SanidadeXAno	2	20,66	10,33	4,75	0,0104
Época de Avaliação (ED)	2	31,88	15,94	7,33	0,0010
SanidadeXED	2	16,30	8,15	3,75	0,0265
Erro	118	256,70	2,1754		

CV: 29,01

Pelo teste de média, apenas a variável fotossíntese apresentou diferença estatística ($p \leq 0,05$), somente na primeira época de avaliação. As médias das variáveis, condutância estomática e evapotranspiração, não diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$)(Fig. 12).

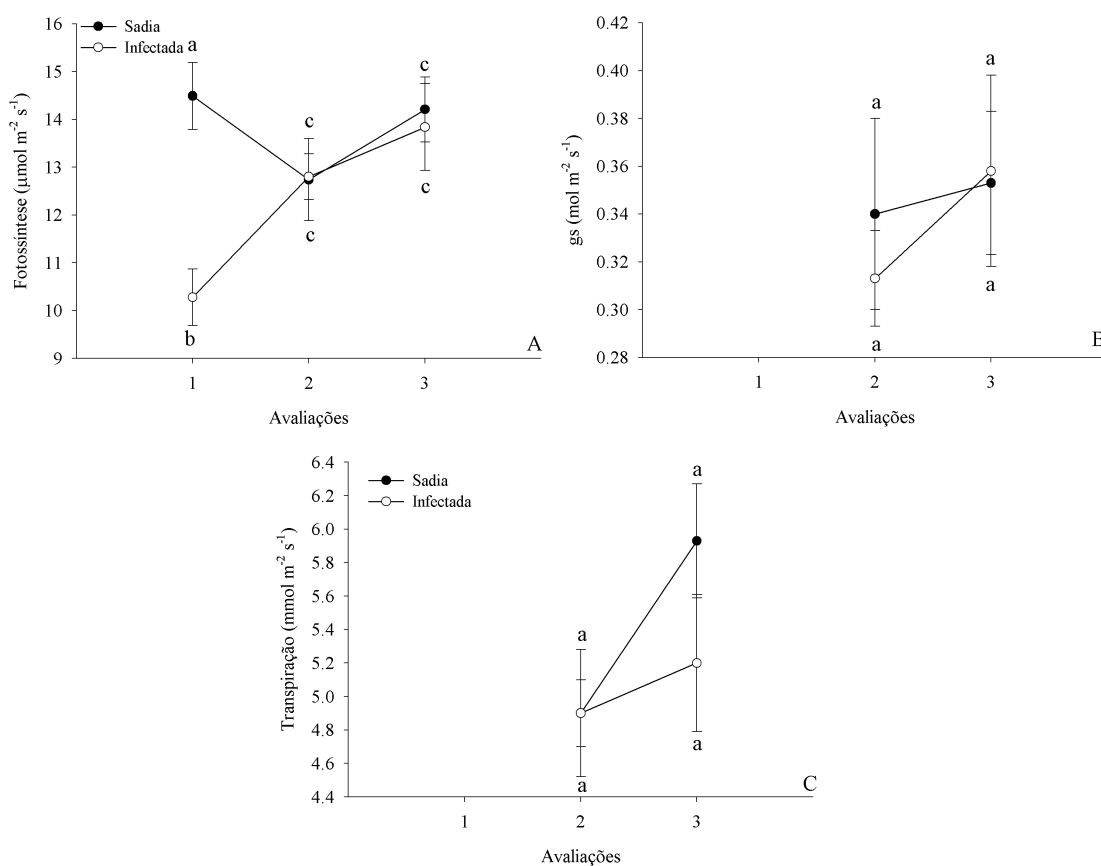


Fig. 12. Avaliação das variáveis fisiológicas em plantas de alho (*Allium sativum*) sadias e infectadas pelo complexo viral durante três anos. Variáveis: Fotossíntese (A); Condutância estomática (B); Transpiração (C).

1, 2 e 3: avaliações aos 30, 60 e 90 dias após o plantio. Os valores das médias obtidos (média de 3 anos) seguidas das mesmas letras na mesma reta não diferem estatisticamente e as médias seguidas das mesmas letras, porém em caixas diferentes (minúscula e maiúscula) diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.2. Pigmentos Fotossintéticos

Pelo teste de F, foram encontradas evidências de diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, entre todos os tratamentos para as variáveis de pigmentos fotossintéticos (Tab. 18, 19 e 20).

Tab. 18. Análise de variância da variável clorofila *a*.

Fator	GL	SQ	QM	F	P
Sanidade	1	574,38	574,38	45,29	□ 0,0001
Ano	2	4674,47	2337,23	184,27	□ 0,0001
SanidadeXAno	2	133,20	66,60	5,25	0,0064
Época de Avaliação (ED)	2	1943,30	971,65	76,61	□ 0,0001
SanidadeXED	2	2,24	1,12	0,09	0,9152
Erro	134	1699,61	12,68		

CV: 14,18

Tab. 19. Análise de variância da variável clorofila *b*.

Fator	GL	SQ	QM	F	P
Sanidade	1	87,87	87,87	38,21	□ 0,0001
Ano	2	143,83	71,91	31,27	□ 0,0001
SanidadeXAno	2	26,54	13,27	5,77	0,0039
Época de Avaliação (ED)	2	355,95	177,97	77,39	□ 0,0001
SanidadeXED	2	22,46	11,23	4,88	0,0090
Erro	134	308,15	2,29		

CV: 17,53

Tab. 20. Análise de variância da variável carotenóides totais.

Fator	GL	SQ	QM	F	P
Sanidade	1	12,85	12,85	20,41	□ 0,0001
Ano	2	157,33	78,66	124,86	□ 0,0001
SanidadeXAno	2	9,95	4,97	7,90	0,0006
Época de Avaliação (ED)	2	85,28	43,14	68,48	□ 0,0001
SanidadeXED	2	4,42	2,21	3,51	0,0328
Erro	129	81,27	0,63		

CV: 17,85

Pelo teste de Tukey, os dados de concentração de clorofila a, b e total diferiram estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, para os tratamentos, em todas as épocas de avaliação (Fig. 13). A concentração de carotenóides não variou significativamente entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Fig. 13).

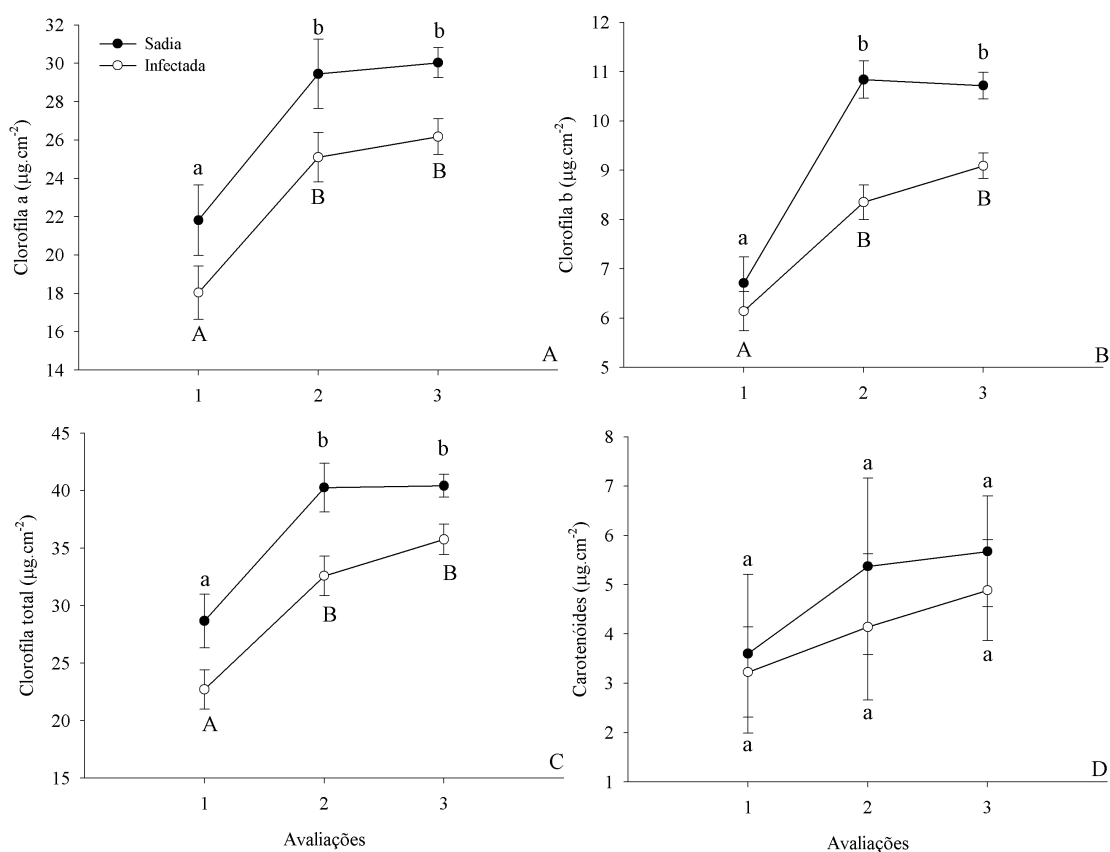


Fig. 13. Avaliação da concentração de pigmentos fotossintéticos em plantas de alho (*Allium sativum*) livre de vírus e infectadas por um complexo viral durante três anos. Variáveis: Clorofila a (A); Clorofila b (B); Clorofila total (C); Carotenóides (D). 1,2 e 3: avaliações aos 30, 60 e 90 dias após o plantio. Os valores das médias obtidos (média de 3 anos) seguidas das mesmas letras na mesma reta não diferem estatisticamente e as médias seguidas das mesmas letras, porém em caixas diferentes (minúscula e maiúscula) diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.3. Atividade da Rubisco

Pelo teste de F, não houve diferença significativa, para a atividade da Rubisco entre os tratamentos (Tab. 21). As médias desta variável, não diferiram entre si ($p < 0,05$) (Fig. 14).

Tab. 21. Análise de variância da variável atividade da rubisco.

Fator	GL	SQ	QM	F	P
Sanidade	1	0,0042	0,0042	1,40	0,2429
Ano	0	0	.	.	.
SanidadeXAno	0	0	.	.	.
Época de Avaliação (ED)	2	0,0601	0,0300	10,05	0,0003
SanidadeXED	2	0,1937	0,0096	3,24	0,0498
Erro	40	0,11	0,03		

CV: 6,92

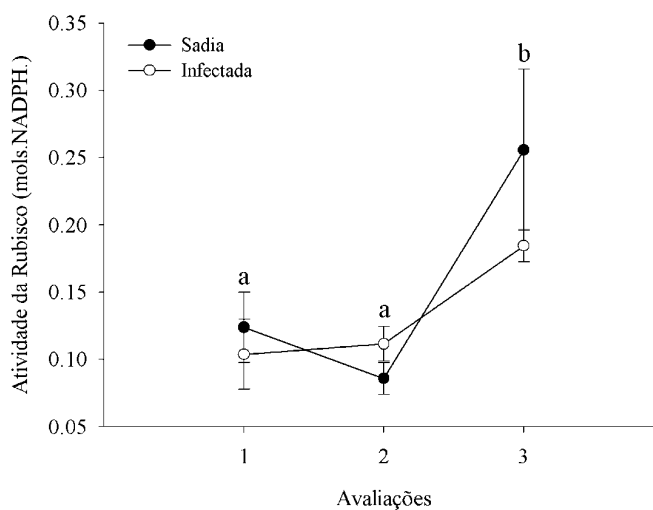


Fig. 14. Avaliação da atividade da Rubisco em plantas de alho (*Allium sativum*) sadias e infectadas por um complexo viral durante três anos. 1,2 e 3: avaliações aos 30, 60 e 90 dias após o plantio. Os valores das médias obtidos (média de 3 anos) seguidas das mesmas letras na mesma reta não diferem estatisticamente e as médias seguidas das mesmas letras, porém em caixas diferentes (minúscula e maiúscula) diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.4. Proteínas Totais

Pelo teste de F, não houve diferença significativa, para a variável proteína total, entre os tratamentos (Tab. 22). As médias desta variável, não diferiram entre si ($p < 0,05$) (Fig. 15).

Tab. 22. Análise de variância da variável proteínas totais.

Fator	GL	SQ	QM	F	P
Sanidade	1	3,37	3,37	0,70	0,4049
Ano	2	7,16	358,22	74,12	□ 0,0001
SanidadeXAno	2	0,91	0,45	0,10	0,9093
Época de Avaliação (ED)	2	8,09	4,04	0,84	0,4351
SanidadeXED	2	4,63	2,31	0,48	0,6201
Erro	134	647,62	4,83		

CV: 26,04

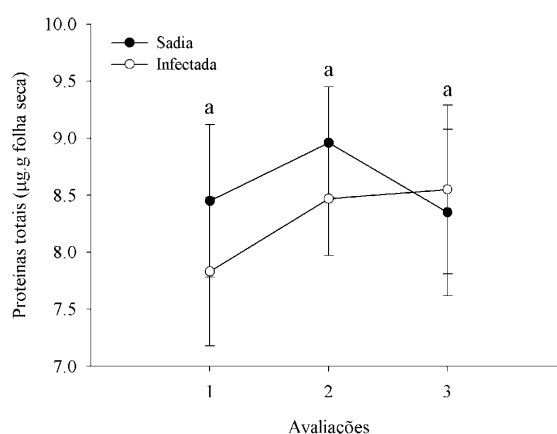


Fig. 15. Avaliação da concentração de proteínas totais em plantas de alho (*Allium sativum*) sadias e infectadas por um complexo viral durante três anos. 1, 2 e 3: avaliações aos 30, 60 e 90 dias após o plantio. Os valores das médias obtidos (média de 3 anos) seguidas das mesmas letras na mesma reta não diferem estatisticamente e as médias seguidas das mesmas letras, porém em caixas diferentes (minúscula e maiúscula) diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.5 Açúcares Solúveis Totais

Pelo teste de F, não houve diferença significativa, para a variável açúcar solúvel totais, entre os tratamentos (Tab. 23). As médias desta variável, não diferiram entre si ($p < 0,05$) (Fig. 16).

Tab. 23. Análise de variância da variável açúcar solúvel total aos 60 e 90 DAP, em cinco horários do dia, no ano de 2007.

Fator	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Sanidade	1	0,0282	0,0282	0,08	0,7840
Época de Avaliação (ED)	1	0,0071	0,0071	0,02	0,8906
SanidadeXED	1	0,3294	0,3294	0,09	0,7671
Tempo	4	1,1270	0,2817	0,75	0,5577
SanidadeXTempo	4	3,0686	0,7671	2,05	0,0897
EDXTempo	4	5,3933	1,3483	3,60	0,0076
SanidadeXEDXTempo	4	0,5879	0,1469	0,39	0,8138
Erro	173	64,79	0,3745		

CV: 12,53

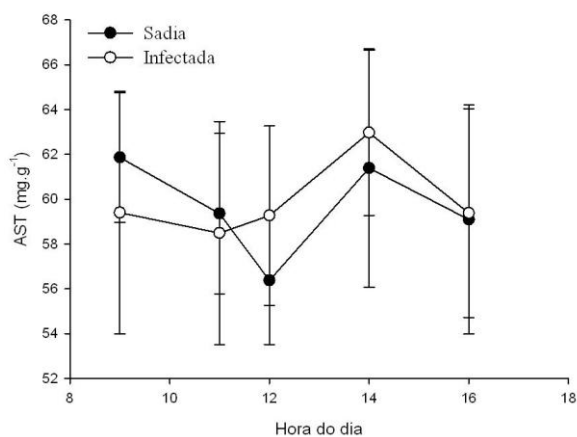


Fig. 16. Avaliação da concentração de açúcares solúveis totais em plantas de alho (*Allium sativum*) sadias e infectadas por um complexo viral no ano de 2007, aos 90 dias após o plantio. AST: Açúcar Solúvel Total. As médias não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. Alterações citológicas em plantas de alho sadias e infectadas pelo complexo viral

As células de plantas sadias apresentaram cloroplastos com formato normais (Fig. 17. A) com pequenas porções de grãos de amido e lipídeos presentes nas células (Fig. 17 B.). O maior acúmulo de lipídeos na célula sadia foi observado fora dos cloroplastos (Fig. 17. A). Porém, nas células infectadas esse acúmulo ocorreu dentro dos cloroplastos (Fig. 17. C e D). Além do acúmulo de lipídeos no seu interior, os cloroplastos das células infectadas apresentaram-se expandidas devido ao evidente acúmulo de lipídeos em seu interior e sem definição estrutural quando comparados aos cloroplastos de células não infectadas (Fig. 17 C e D).

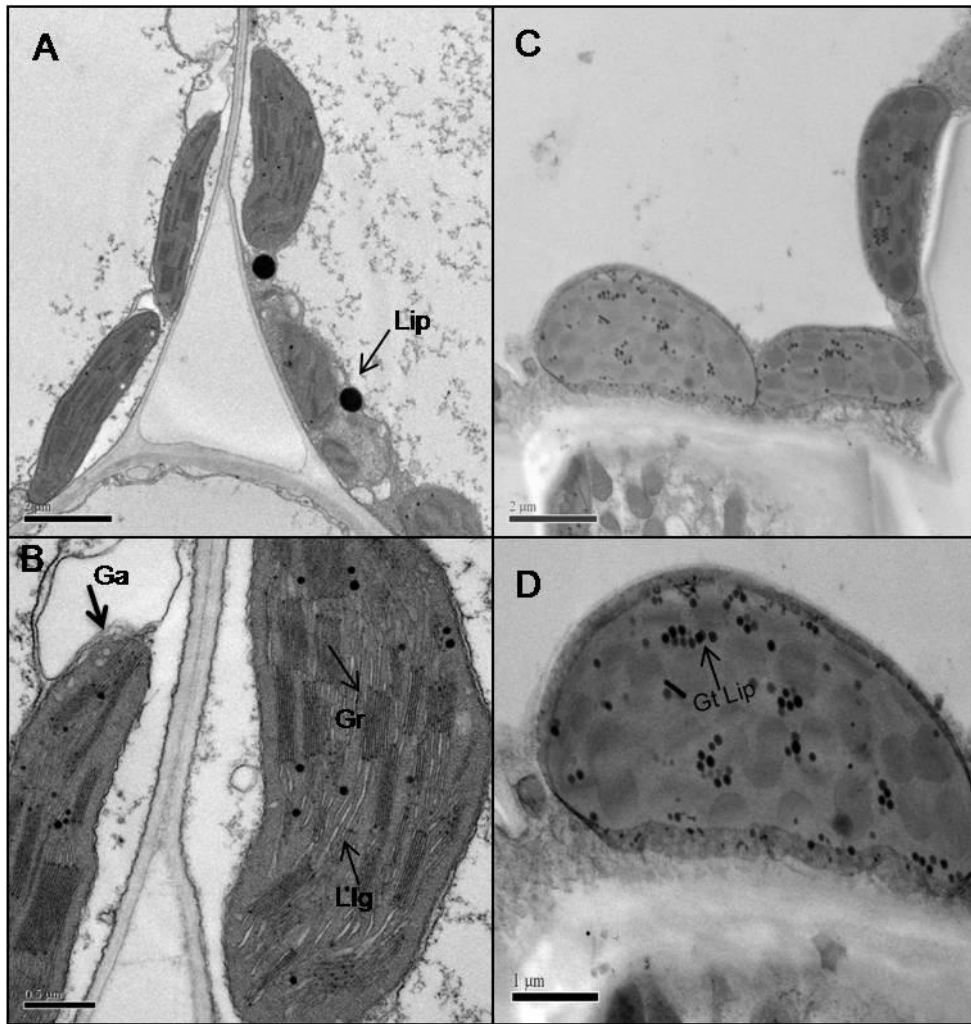


Fig. 17. Microscopia eletrônica de sessões ultra-finas do mesófilo de células de folhas de planta de alho (*Allium sativum*) sadias e infectadas por *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus* coletadas às 9:00h aos 60 DAP. A. Visão geral da disposição dos cloroplastos da célula sadia. Seta: adensamento de lipídeos externamente ao cloroplasto. B. Cloroplasto em célula sadia. Ga: grão de amido; Gr: Granum; Llg: Lamela intergrana. Gt Lip: gotículas de lipídeos. C. Visão geral da disposição dos cloroplastos da célula infectada. D. Cloroplasto em célula infectada com acúmulo de lipídeos.

IV. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi observada uma diminuição acentuada nos componentes da biomassa entre as plantas sadias e infectada aos 30, 60 e 90 DAP (Fig.11). Resultados semelhantes foram obtidos por Tanabe (1999), Fajardo *et al.* (2002) e Melo-Filho (2003) quando avaliaram altura de plantas de alho infectadas pelo complexo viral, aos 60 e 90 DAP. Entretanto, as maiores diferenças observadas nos componentes da biomassa foram aos 30 DAP (Fig. 11). Aparentemente, o início do desenvolvimento é o período mais crítico, pois as alterações no crescimento são mais visíveis. Este comportamento também foi encontrado em outras espécies, como abobrinha (*Cucurbita pepo* cv. Caserta) inoculadas com dois *Potyvirus*: o *Papaya ringspot virus* (PRSV) e o *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), que apresentaram sintomas doze dias após a emergência das plântulas. Esses sintomas incluíam redução significativa de área foliar, massa fresca e massa seca (Pereira *et al.*, 2006). Em alho é comum ocorrer re-infecção do material propagativo pelos vírus do complexo viral e resultando nas diferenças determinadas em relação as variáveis de crescimento relatadas neste trabalho. Estes efeitos da infecção viral podem acarretar queda de produtividade na cultura de, aproximadamente, 55% dependendo do nível de re-infecção viral do material utilizado para plantio (Melo-Filho *et al.*, 2006).

A infecção causada por vírus, em plantas susceptíveis, normalmente induz sintomas de mosaicos, de cloroses ou de mosqueado em folhas infectadas sistemicamente. No caso da infecção causada pelos vírus do complexo do alho podem ser observadas sintomas leves de

mosaico ou mesmo não se observar sintomas, como ocorreu com a maioria das plantas analisadas. Essas alterações morfológicas estão relacionadas com as alterações fisiológicas. Nas avaliações realizadas no presente trabalho, a taxa de assimilação de CO₂ (fotossíntese máxima) foi estatisticamente superior em plantas de alho sadias analisadas aos 30 DAP. Entretanto, essas diferenças desapareceram aos 60 DAP e 90 DAP, pois tanto plantas sadias como infectadas apresentaram taxas semelhantes de assimilação de CO₂. O aumento nas taxas de fotossíntese observadas entre a primeira avaliação e as duas últimas nas plantas infectadas, refletem um atraso na maturidade fisiológica das folhas aos 30 DAP (expansão máxima e cloroplastos completamente diferenciados e funcionais). Essas plantas parecem não estar sendo influenciadas pela infecção viral quando maduras (Fig. 12. A). Paralelamente, a taxa de transpiração e a condutância estomática não variaram aos 60 e 90 DAP entre as plantas sadias e infectadas (Fig. 12. B e C). Em videira (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein) infectada com o *Grapevine leafroll associated virus* (GLRV) a taxa fotossintética, a condutância estomática e a taxa de transpiração foram reduzidas significativamente em comparação com plantas sadias (Bertamini *et al.*, 2004). Resultados semelhantes aos encontrados para a videira foram obtidos para a taxa fotossintética nos patossistemas rabanete (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus*) e *Turnip mosaic virus* (Guo *et al.*, 2005) e cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) (Clover *et al.*, 1999). Em cana-de-açúcar a queda na taxa fotossintética foi associada com a redução da massa seca. No presente trabalho, aos 30 DAP, foi

observada uma diferença em massa seca de 100% entre as plantas saudas e infectadas, o que poderia explicar em parte a diferença encontrada para a taxa fotossintética nesta avaliação. Mas esta explicação não se sustenta, ao se analisarem os resultados observados aos 60 DAP, quando não se observou diferença na taxa fotossintética entre os tratamentos, apesar das diferenças nas variáveis de crescimento. Neste trabalho, as plantas infectadas não apresentaram sintomas ou estes eram muito discretos. Analisando a taxa fotossintética em plantas sintomáticas e assintomáticas de amendoim (*Arachis hypogaea*), infectadas por *Tomato spotted wilt virus* (TRSV), Rowland *et al.* (2005) verificaram uma queda de 30 a 51% na taxa fotossintética nas plantas infectadas. Entretanto, Arias *et al.* (2003) avaliando a assimilação de CO₂, em plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) assintomáticas e infectadas com os *Potyvirus*, *Sunflower chlorotic mottle virus* (SCMV), observaram que estas não diferiram na taxa fotossintética, condutância estomática, taxa de respiração e na concentração de carboidratos, quando comparadas com as plantas saudas. Esses resultados assemelham-se aos obtidos para o alho aos 60 e 90 DAP. Aos 30 DAP a diferença observada pode ser devida ao atraso na brotação e ao desenvolvimento inicial das plantas infectadas devido à presença viral nos bulbilhos, sendo que houve uma recuperação das mesmas ao longo do ciclo da cultura em relação a níveis normais de taxas fotossintéticas.

Na análise dos pigmentos fotossintéticos verificaram-se diferenças entre as plantas saudas e infectadas para os níveis de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total, porém em relação aos carotenóides não se observou

diferença (Fig. 13). Normalmente, nos processos infecciosos causados por vírus os níveis de pigmentos fotossintéticos são reduzidos (Guo *et al.*, 2005; Bertamini *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.*, 2004; Sampol *et al.*, 2003). Entretanto, esse resultado não foi verificado em relação aos carotenóides. Isso explicaria em parte, os resultados obtidos para a regulação da atividade da enzima Rubisco e a produção de carboidratos nas plantas infectadas, que não diferiu das plantas saudáveis (Fig. 15 e 16). Os pigmentos fotossintéticos são responsáveis pela captação da energia luminosa para funcionamento dos fotossistemas II e I, para a produção de NADH e ATP na fase fotoquímica da fotossíntese. Esses produtos finais serão utilizados na fase de carboxilação para a produção de carboidratos (Taiz & Zeiger, 2009). Tendo-se verificada a queda dos teores de clorofila *a* e *b*, como poderia estar acontecendo à captação de energia para a alimentação dos fotossistemas? Os carotenóides têm como função primordial, proteger o aparato fotossintético do excesso de energia luminosa por dissipação térmica, porém eles também participam, como pigmentos acessórios, na captação de energia luminosa nas membranas fotossintéticas (Sieferman-Harms, 1987). Provavelmente, nas plantas infectadas essa demanda de captação de energia luminosa esteja sendo suprida parcialmente pelos carotenóides. O gene *psy* é o responsável pela biossíntese de carotenóides nas folhas (Bartley & Scolnik, 1993). Avaliando a superexpressão do gene *psy 2* em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), Busch *et al.* (2002) verificaram redução na quantidade de clorofila e um aumento de até 400% no teor de carotenóides totais, embora essas plantas não tenham exibido diferenças

fenotípicas ou metabólicas quando comparadas com as plantas sem alteração genética. Segundo esses autores, o aumento do teor de carotenóides pode ser avaliado pelo acúmulo de fitoeteno nas folhas, o que comprovaria um aumento do fluxo de metabólitos para a biossíntese de carotenóides. Assim, em avaliações posteriores recomenda-se que seja verificada a possibilidade de as plantas de alho infectadas pelo complexo viral estarem superexpressando o gene *psy*, como forma de reparo do aparato fotossintético para suprir a demanda de captação de energia luminosa nos fotossistemas.

Em plantas, onde ocorrem desbalanços nos fotossistemas, a atividade da Rubisco pode ficar comprometida e conseqüentemente ocorrer queda na quantidade de proteínas solúveis e carboidratos (Sampol *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2005; Bertamini *et al.*, 2004). Essa enzima é responsável pela incorporação do CO₂ atmosférico, pelo primeiro passo do ciclo de Calvin para a formação dos carboidratos, além de ser a proteína mais abundante nas plantas (Taiz & Zeiger, 2009). No presente trabalho a atividade da enzima não diferiu estatisticamente entre as plantas infectadas e sadias (Fig. 15) e como conseqüência, não foi observada alteração na quantidade de proteínas totais (Fig. 16) e nem de carboidratos, especificamente açúcares solúveis totais (Fig. 17). O amido, outro carboidrato muito comum na maioria das plantas correlacionado diretamente com a fotossíntese não foi detectado em raiz, bulbilhos e folhas de plantas de alho, em nenhum momento do dia, tanto em planta sadias como em infectadas.

A produção de carboidratos nas plantas sadias foi semelhante a das plantas infectadas, entretanto entre 12 e 14h observou-se um ligeiro aumento do metabólito nas plantas infectadas, entretanto não foi diferente estatisticamente. Como os carboidratos são fonte de energia para o crescimento das plantas, seria esperado que as variáveis de crescimento não diferissem entre as plantas sadias e as infectadas. Mas observou-se uma queda expressiva em todas as variáveis de crescimento das plantas infectadas (Fig. 11), o que poderia indicar, então, uma deficiência na translocação desses metabólitos das folhas das plantas infectadas para outras partes da planta. Os vírus, a exemplo dos *Potyvirus* podem alterar o tamanho dos plasmodesmas (Aaziz *et al.*, 2001; Gonçalves *et al.*, 2004) e afetar o movimento dos fotoassimilados (Wolf *et al.*, 1995). Portanto, para esclarecer esta questão se sugerimos quantificar os açúcares da série rafínosica (rafinose, estaquiose, verbascose) nas plantas infectadas, visto que estes são sinalizadores do transporte dos metabólitos via simplasto (Taiz & Zeiger, 2009) ou plasmodesmas. Alterações na produção dos mesmos poderiam estar relacionadas, com alterações, causadas nos plasmodesmas, pelas partículas virais.

Os vírus além de serem responsáveis por inúmeras modificações nos processos fisiológicos e metabólicos, também podem causar alterações citológicas, inclusive nos cloroplastos. Em células de plantas sadias foram observados cloroplastos normais, com poucas inclusões de lipídeos, sendo que as maiores concentrações ocorrem em regiões da célula externa aos cloroplastos (Fig. 17 A e B). Kamanna & Chandrasekhara (2008) observaram que bulbilhos de alho contém 62,6 %

de lipídeos, sendo que 14% são glicolipídeos e 23,4% são fosfolipídeos. Esses lipídeos também estão presentes nas folhas em, aproximadamente, 0,06% do massa da folha, na forma de compostos sulfurosos (Edris & Fadel, 2001). Apesar de não terem sido detectados pelo ensaio enzimático, pequenos grãos de amido foram observados nos cloroplastos das células de plantas saudas. Esses grãos, classificados como transitórios, são produzidos durante o período fotossintético, mas são rapidamente metabolizados durante o período noturno (Avigad & Dey, 1997). Os cloroplastos das plantas infectadas apresentaram expansão, desorganização e acúmulo de gotículas de lipídeos. El-Ela *et al.* (2006) verificaram, em folhas de cravo infectadas por *Carnation vein motle virus* (CVMV) a presença de células completamente degradadas e cloroplastos expandidos e sistemas de membranas desorganizados. Semelhantemente, Musetti *et al.* (2002) observaram plantas de milho infectadas por *Luteovirus* com cloroplastos anormais e com um acúmulo anormal de grãos de amido. Provavelmente, o excesso de lipídeos no interior dos cloroplastos, está envolvido com os mecanismos de defesa da planta de alho infectada, o qual deve ser posteriormente investigado.

As diferenças nas variáveis que quantificam as alterações fisiológicas, bioquímicas e citológicas podem variar conforme o patossistema estudado, entretanto o resultado final será normalmente a queda de produção na cultura, portanto é necessário o estudo detalhado do patossistema em questão para que num futuro próximo seja possível a aplicação de controles efetivos, como a descoberta de genes de resistência, visando neutralizar os efeitos das infecções virais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS:

As infecções de plantas de alho pelo complexo viral causam significativas perdas de produção para a cultura. A forma de propagação vegetativa da cultura é um facilitador na transmissão de várias espécies de vírus ao longo dos ciclos de plantio. O alho-semente utilizado pela maioria dos alhicultores no Brasil está infectado por alguma espécie viral, devido, principalmente, à ausência de um programa de controle da sanidade do material de propagação. Esta limitação, leva ao acúmulo da concentração viral nos cultivos sucessivos, causando uma redução de produtividade, em peso e qualidade de bulbos.

Uma forma eficiente de manejo da cultura é a utilização de bulbilho-semente livre de vírus originado de cultura de meristemas e ápices caulinares, tecnologia que pode aumentar a produtividade da cultura em mais de 100% em apenas um ciclo de cultivo. Visando aperfeiçoar o sistema produtivo de alho no Brasil, a Embrapa Hortaliças vem desenvolvendo um Programa de Produção de Alho Semente-Livre de Vírus, sendo que dentro deste programa, destaca-se a implantação de um sistema de indexação viral das plantas. Atualmente, o método mais utilizado para esse processo é o sorológico. Entretanto, este apresenta várias limitações, principalmente a deficiência em detectar baixas concentrações virais, fato que compromete a produção eficiente do alho livre de vírus. Neste trabalho foram desenvolvidas duas técnicas moleculares para detecção viral ("Dot Blot hibridização com sondas moleculares não-radioativas e RT-PCR) que podem atuar conjuntamente para aumentar a sensibilidade e especificidade da indexação, diminuindo-

se assim, o tempo de produção do alho-semente livre de vírus. Torna-se necessário agora, empreender esforços para desenvolver e adaptar essas técnicas, visando à detecção viral em extrato bruto de plantas e a aplicação dessas técnicas em larga escala permitindo a indexação de um grande volume de alho semente em um curto espaço de tempo. Com o desenvolvimento da RT-PCR espécie-específica, foi possível realizar uma análise da qualidade fitossanitária do alho plantado em aproximadamente 76 % das regiões produtoras de alho no Brasil. Os resultados revelaram a ocorrência das seis espécies do complexo viral (já caracterizadas no Brasil) em todas as regiões analisadas. Mostrou também que a ocorrência e a prevalência das espécies virais estão diretamente relacionadas ao sistema produtivo empregado e as variedades de alho cultivadas em cada condição. Essa alta disseminação viral revela a baixa qualidade fitossanitária do material propagativo utilizado pelo produtor rural, fato que explicaria a queda de produtividade enfrentada pelo setor. Esse monitoramento deve ser contínuo servindo como um indicador da disseminação das espécies virais do alho nas diversas regiões produtoras do país.

No ano de 2007, a produção nacional de alho foi de aproximadamente, 91.000 t. Caso o Brasil tivesse um sistema de produção e fiscalização eficientes da qualidade fitossanitária das sementes utilizadas no país, seria possível dobrar a produção nacional. O simples uso de semente comprovadamente sadia poderia representar um ganho anual expressivo de aproximadamente R\$ 691.600.000 (valor calculado pelo preço mínimo do alho praticado nas regiões Sul, Sudeste,

Centro-Oeste e Nordeste, de acordo com o Plano Agrícola Pecuário 2010-2011). Tal perspectiva de ganho produtivo e qualitativo demonstra a importância do monitoramento da qualidade fitossanitária do alho-semente via indexação viral com técnicas sensíveis e específicas. Existe, portanto, a necessidade de ações conjuntas com os diferentes atores do processo produtivo visando minimizar os prejuízos causados pelo complexo viral do alho nas diversas regiões produtoras no Brasil.

Além do estabelecimento de um sistema de indexação viral eficiente, a compreensão do processo infeccioso desses patógenos na hospedeira poderia contribuir para o manejo eficiente da cultura do alho. Estudar os efeitos da infecção viral na hospedeira é importante para compreender os mecanismos de atuação do patógeno, que se diferencia para cada patossistema, e os mecanismos de defesa da planta desencadeados pela infecção viral. No presente trabalho foram observadas alterações significativas nos processos fisiológicos, metabólicos e bioquímicos nas plantas de alho infectadas. Essas alterações parecem representar respostas metabólicas contra o ataque do patógeno e possivelmente poderiam se manifestar via superexpressão de genes ligados à reação de resistência da hospedeira, liberação de ácidos graxos de composição organofosforada no interior dos cloroplastos e modificação da rota de translocação de carboidratos. Os resultados apresentados neste trabalho representam informações iniciais no entendimento da interação patógeno/hospedeiro. Essas reações envolvidas na interação vírus/alho deveriam ser melhor estudadas, visando compreender os mecanismos de defesa que estão atuando nesse

patossistema. Essas informações, potencialmente, poderiam contribuir para o desenvolvimento de estratégias visando estimular as respostas de defesa nas plantas de alho e, conseqüente, o aumento da produção desta hortaliça.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAZIZ, R.; DINAT, S. & EPEL, B. Plasmodesmata and plant cytoskeleton. Trends Plant Science 6: 326-330. 2001.

ABREU, E. F. M. & ARAGÃO, F. J. L. Isolation and characterization of a myo-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress. Annals of Botany 99: 285–292. 2007.

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; BAR-JOSEPH, M.; BRUNT, A. A.; CANDRESSE, T.; FOSTER, G. D.; MARTELLI, G. P.; MILNE, R. G. & FAUQUET, C. M. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. Archives of Virology 149: 1045-1060. 2004.

ALVES-JÚNIOR, M.; MARRACCINI, F. M.; MELO- FILHO, P. A.; DUSI, A. N.; PIO-RIBEIRO, G. & RIBEIRO, B. M. Recombinant expression of Garlic virus C (GARV-C) capsid protein in insect cells and its potential for the production of specific antibodies. Microbiological Research 163: 354-361. 2008.

AMARAL, L. I. V.; GASPAR, M, C. P. M. F. ; AIDAR, M. P. M. & BUCKERIDGE, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. Hoehnea 34: 425-431. 2007.

AGRIOS, G. N. Plant pathology. Elsevier: Academic Press (5th). Burlington,. Massachusetts, 2005. 952 p.

ASSIS, M. I. T.; CARVALHO, M. G. & MACIEL-ZAMBOLIM, E. Detecção de vírus do nanismo amarelo da cebola (OYDV), em clones de alho (*Allium sativum*) mediante dois testes sorológicos. Fitopatologia Brasileira 18: 288. 1993.

ARIAS, M. C.; LENARDON, S. & TALEISNIK, E. Carbon metabolism alterations in sunflower plants infected with the *Sunflower chlorotic mottle virus*. *Journal of Phytopathology* 151: 267-273. 2003.

AVIGAD, G. & DEY, P.M. Carbohydrate metabolism: Storage carbohydrates. In: Dey P.M. & Harborne J.B. (eds), *Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego. 1997. pp 143-204.

AYRES, P. G.; PRESS, M.C, & SEPENCER-PHILLIPS, P. T. N. Effects of pathogens and parasitic plants on source/sink relationships. In: Zamski E., Schaffer, A. *Photoassimilate distribution in plants and crops*. Ed. New York: Marcel Dekker, 1996. 20p

BARG, E. L. D-E; VETTEN, H. J. & GREEN, S. K. Identification, partial characterisation and distribution of viruses infecting *Allium* crops in south and south-east Asia. *Acta Horticulture* 358: 251-258. 1994.

BARG, E. L. D-E; VETTEN, H. J. & GREEN, S. K. Viruses of *Alliums* and their distribution in different *Allium* crops and geographical regions. *Acta Horticulture* 433: 607-616. 1997.

BARTLEY, G. E.; SCOLNIK, P. A. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell* 7: 1027-1038. 1995.

BELLARDI, M.G.; MARANI, F.; BETTI, L.; RABITI, A.L. Detection of *Garlic common latent virus* (GCLV) in *Allium sativum* L. in Italy. *Phytopathology* 34: 58-61. 1995.

BERTAMINI, M. MUTHUCHELIAN, K. & NEDUNCHEZHIAN, N. Effect grapevine leafroll on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). *Journal of Phytopathology* 152: 145-152. 2004.

BIANCHI, A.; ZAMBONELLI, A.; ZECHINI D'AULERIO, A. & BELLESIA, F. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi in vitro. *Plant Disease* 81: 1241-1246. 1997.

BIELESKI, R. L. & TURNER, A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Analytical Biochemistry* 17: 278-293. 1966.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54. 1976.

BUSCH, M.; SEUTER, A. & DINGER HAIN, R. Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology* 128: 439–453. 2002.

CAFRUNE, E. E.; PEROTTO, M. C. & CONCI, V. C. Effect of two *Allexivirus* isolates on garlic yield. *Plant Disease* 90: 898-904. 2006.

CALDAS, L. S.; BRAVO, C.; PICCOLO, H. & FARIA, C. R. S. M. Measurement of leaf area with a handscanner linked to a microcomputer. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 4: 17-20. 1992.

CANAVELLI, A.; NOME, S. F. & CONCI, V. C. Efecto de distintos virus en la producción de ajo (*Allium sativum*) Rosado Paraguayo. *Fitopatologia Brasileira* 23: 354-358. 1998.

CHEN, Y. W.; ZHENG, H. Y.; ADAMS, M. J. & CHEN, J. P. Serological relationships among the over-expressed coat proteins of *Allexivirus*. *Journal of Phytopathology* 156: 251-255. 2008.

CLOVER, G. R. G.; AZAM-ALI, K. W. J. & SMITH, H. G. The effects of beet yellows virus on the sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant Pathology* 48: 129-138. 1998.

CONCI, V. C. & NOME, S. F. Aislamento del garlic yellow streak virus en Argentina. *Fitopatologia Brasileira* 26:19-22. 1991.

CONCI, V. C.; LUNELLO, P. & BURASCHI, D. Variations of *Leek yellow stripe virus* concentration in garlic and its incidence in Argentina. *Plant disease* 86: 1085-1088. 2002.

CONCI, V. C., CANAVELLI, A. E. & LUNELLO, P. A. Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. *Plant Disease* 87: 1411-1415. 2003.

COSTA, C. L. Vetores de vírus de plantas, I:Insetos. In: Luz, W. C. (Ed). *Revisão Annual de Patologia de Plantas* 6: 103-171. 1998.

COSTA, M. H. O. Construção de um vetor baculoviral modificado capaz de produzir proteínas fusionadas a Poliedrina. Universidade de Brasília. Tese de Mestrado. 2008. 102 p.

DANIELS, J.; LIN, M. T. & KITAJIMA, E. W. Purificação de um potyvirus causador de mosaico do alho. *Fitopatologia Brasileira* 3:82. 1978a.

DE SOUZA, W. Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica. Vol 1. SBME, Rio de Janeiro. 1989. 105p.

DI FRANCO, A.; RUSSO, M. & MARTELLI, G. P. Ultrastructure and origin of cytoplasmic multivesicular bodies induced by *Carnation Italian ringspot virus*. *Journal of General Virology* 65: 1233-1237. 1984.

DOVAS, C. I.; MAMOLOS, A. P. & KATIS, N. I. Fluctuations in concentration of two potyviruses in garlic during the growing period and sampling conditions for reliable detection by ELISA. *Annal Applied of Biology* 140: 21-28. 2002.

DOVAS, I. C.; HATZILOUKAS, E.; SALOMON, R.; BARG, E.; SHIBOLETH, Y. & NIKOLAOS, I. K. Incidence of viruses infecting *Allium* spp. in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 107: 677-684. 2001.

DUBOIS, M.; GILLER, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. & SMITH, F. Colorimetric method for determinations of sugars and related substance. *Analytic Chemistry* 28: 350-356. 1956.

EDRIS, A. E. & FADEL, H. M. Investigation of the volatile aroma components of garlic leaves essential oil. Possibility of utilization to enrich garlic bulb oil. *European Food Research and Technology* 214: 105-107. 2001.

EL-ELA A. A. A; AMER, M. A. & KHATAB, E. A. H. Cytological and molecular studies of an Egyptian isolate of *Carnation vein mottle Potyvirus*. *Egyptian Journal of Virology* 3: 1-18. 2006.

FAJARDO, T. M. V. Estudo de degenerescência por viroses e caracterização molecular do complexo viral da cultura do alho. Tese (Doutorado). Brasília, Universidade de Brasília, Brasília, 1998. 113p.

FAJARDO, T. V. M.; NISHIJIMA, M.; BUSO, J. A.; TORRES, A. C.; ÁVILA, A. C. & RESENDE, R. O. Garlic Viral Complex: Identification of *Potyriviruses* and *Carlavirus* in Central Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 26: 619-626. 2001.

FAJARDO, T.V.M.; KUHN, G.B.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Detecção de *Closterovirus* em videira e caracterização parcial de um isolado do *Grapevine leafroll-associated virus*. *Fitopatologia Brasileira* 27: 58-64. 2002.

FAJARDO, T. V. M; EIRAS, M.; SANTOS, H. P.; NICKEL, O. & KUHN, G. B. Detecção e caracterização biológica e molecular de *Rupestris stem pitting associated virus* e seu efeito na fotossíntese de videiras. *Fitopatologia Brasileira* 29: 209-214. 2004.

FAO. Disponível em: <http://www.fao.org/>. Acessado em: 23/08/2009.

FILGUEIRA, F.A.R. Aliáceas, cebola e outros condimentos. In: FILGUEIRA, F.A.R. (Ed.) Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2 ed. Viçosa: UFV, 2000. v.1, pp. 246-268.

GONÇALVES, M. C.; VEGA, J.; OLIVEIRA, J. G. & GOMES, M. M. A. *Sugarcane yellow leaf virus* infection leads to alterations in photosynthesis efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves. *Fitopatologia Brasileira* 30: 10-16. 2005.

GUO, Y. P.; PENG, Y. & CHEN, J. S. Photosynthetic responses of radish (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus*) plants to infection by *Turnip mosaic virus*. *Photosynthetica* 43: 457-462. 2005.

HULL, R. *Matthew's Plant Virology*. 4^a Ed. San Diego, CA. Academic Press. 2002. 1001p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.net/home/estatística/economia/pam/tabela/1pam.shtm>. Acesso em : 10/09/2007.

ICTVdb. The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>. Acessado em: 10/08/09.

IVARS, P.; ALONSO, M.; BORJA, M. & HERNÁNDEZ, C. Development of a non-radioactive dot-blot hybridisation assay for the detection of *Pelargonium flower break virus* and *Pelargonium line pattern virus*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 275-283. 2004.

JADÃO, A. S.; PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R. & ZERBINI, M. Efeitos na fotossíntese e área foliar de cultivares de alface inoculadas mecanicamente com patótipos do *Lettuce mosaic virus* e *Lettuce mottle virus*. *Fitopatologia Brasileira* 29: 11-15. 2004.

KAMANNA V. S & CHANDRASEKHARA N. Biochemical and physiological effects of garlic (*Allium sativum* L.). Journal of Science Indian Research 42: 353-357. 1994.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. Ed: Guanabara Koogan, 8 ed. Rio de Janeiro, 2003. pp. 165-176.

KITAJIMA, E. W. & LOVISOLO, O. Mitochondrial aggregates in *Datura* leaf cells infected with *Henbane mosaic virus*. Journal of General Virology 16: 265-271. 1972.

KOO, B. J.; KANG, S. C. & CHANG, M. U. Survey of garlic virus disease and phylogenetic characterization of garlic viruses of genus *Allexivirus* isolated in Korea. Journal of Plant Pathology 18: 237-243. 2002.

LEITE, B. & PASCHOLATI, S. F. Hospedeiro: Alterações fisiológicas induzidas por fitopatógenos. In: Bergamin, A., Kimati, H. & Amorim, L. (Eds) *Manual de Fitopatologia- Vol. 1- Princípios e conceitos*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. pp 393-416.

LOT, H.; CHOVELON, V.; SOUCHE, S. & DELECOLLE, B. Effects of *Onion yellow dwarf* and *Leek yellow stripe* viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. Plant Disease 82: 1381-1385. 1998.

LU, Y. W.; CHEN, H. Y.; ADAMS, M. J. & CHEN, J. P. Serological relationships among the over-expressed coat proteins of allexiviruses. Journal of Phytopathology 156: 251-255. 2008.

LUNELLO, P.; MANSILLA, C. CONCI, V & PONZ, F. Ultra-sensitive detection of two garlic potyviruses using a real-time fluorescent

(Taqman®) RT-PCR assays. *Journal of Virological Methods* 118: 15-21. 2004.

LUNELLO, P.; DUCASSE, D. & CONCI, V. Improved PCR detection of potyviruses in *Allium* species. *European Journal of Plant Pathology* 112: 371-378. 2005.

LUNELLO, P.; DI RIENZO, J. & CONCI, V. C. Yield loss in garlic caused by *Leek yellow stripe virus* Argentinean isolate. *Plant Disease* 91: 153-158. 2007.

PRESTON, R. Measuring plant disease. In: Madden, L. V.; Hughes, G. & Van den Bosch, F. (Eds.). *The Study of Plant Disease Epidemics*. In: APS Press, St. Paul, MN, 2007. pp. 11-31.

MAJUNDER, S.; BARANWAL, V. K. & JOSHI, S. Simultaneous detection of *Onion yellow dwarf virus* and *Shallot latent virus* in infected leaves and cloves of garlic by duplex RT-PCR. *Journal of Plant Pathology* 90: 371-374. 2008.

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

MARTELLI, G. P. Planta virus taxa: properties and epidemiological characteristics. *Journal of Plant Pathology* 79: 151-171. 1997.

MARTIM, R. R.; JAMES, D. & LÉVESQUE, C. A. Impacts of molecular diagnostics technologies on plant disease management. *Annual Review of Phytopathology* 38: 207-239. 2000.

MASSOLA JR, N. S.; JESUS JR., W. C. & KIMATI, H. Doenças do Alho e da Cebola. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Melo-Filho, A.; Camargo, L. E. A. & Rezende, J. A. M. (Eds.). *Manual de fitopatologia: doenças das*

plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, pp. 53-63.

MELO-FILHO, P. A. Detecção e caracterização molecular de *Allexivirus* e estudo de degenerescência em plantas de alho (*Allium sativum* L.) provocada por vírus. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília-DF. 2003. 116p.

MELO-FILHO, P. A.; NAGATA, T.; DUSI, A. N.; BUSO, J. A.; TORRES, A.C.; EIRAS, M. & RESENDE, R. O. Detection of three *Allexivirus* species infecting garlic in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39: 375-340. 2004.

MELO-FILHO, P. A.; RESENDE, R. O.; CORDEIRO, C. M. T.; BUSO, J.A.; TORRES, A.C. ; DUSI, A. N . Viral reinfection affecting bulb production in garlic after seven years of cultivation under field conditions. *European Journal of Plant Pathology* 116: 95-101. 2006.

MENEZES SOBRINHO, J.A. Cultivo do alho (*Allium sativum*). 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1997. 16 p. (Instruções Técnicas, 2)

MENEZES SOBRINHO, J. A; LOPES, C. A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; CHARCHAR, J. M.; CRISÓSTOMO, L. A.; CARRIJO, O. A. & BARBOSA, S. A cultura do Alho. Brasília: Embrapa, 1993. 50 p. (Coleção plantar).

MOTA, J. H.; NOCE, R.; YURI, J. E.; RESENDE, G. M. & SOUZA, R. J.; Análise da evolução da produção e relação risco-retorno para a cultura do alho, no Brasil e regiões (1991 a 2000). *Horticultura Brasileira* 23: 238-241. 2005.

MUSETTI, R.; BRUNI, L. & FAVALI, M. A. Cytological modifications in maize plants infected by *Barley dwarf virus* and *Maize dwarf mosaic virus*. *Micron* 33: 681-686. 2002.

NUNES, A. C. S.; VIANNA, G. R.; CUNEO, F.; AMAYA-FARFA' J. E.; CAPDEVILLE, G. DE; RECH, E. ELÍBIO; ARAGÃO, F. J. L. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPS1*) in transgenic soybean inhibited seed. *Planta* 224: 125-132. 2006.

O'GARA, E. A.; HILL, D. J. & MASLIN, D. J. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2269–2273. 2000.

PAULILO, M. T. S.; BESFORD, R. T. & WILKINS, D. Rubisco and PEP carboxylase responses to changing irradiance in a Brazilian Cerrado tree species, *Qualea grandiflora* Mart. (*Vochysiaceae*). *Tree Physiology* 14: 165-177. 1993.

PEREIRA, M. J. Z.; SUSSELI, A. A. B.; SILVA, R. F. DA; KUHN, J. O.; DOMINGUES, F. & RESENDE, J. Danos na produção da abobrinha de moita causados pelo *Papaya ringspot virus* – type W e *Zucchini yellow mosaic vírus* *Summa Phytopathologica* 33: 192-194. 2007.

PLANT VIRUS SEQUENCE. Disponível em: <http://www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/ppi/link/pplinks/viruseqs/viruses.php>. Acessado em: 15/08/2009.

PRADO, C. H. B. A.; WENHUI, Z.; ROJAS, M.H.C. & SOUZA, G.M. Seasonal leaf gas exchange and water potential in woody cerrado species community. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16: 7-16. 2004.

RADWAN, D. E. M.; FAYEZ, K. A.; MAHMOUD, S. Y.; HAMAD, A. & LU, G. Physiological and metabolic changes of *Curcubita pepo* leaves in response to *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) infection and salicylic acid treatments. *Plant physiology and Biochemistry* 45: 480-489. 2007.

RAHOUTEI, J.; GARCI-LUQUE, I. & BARÓN, M. Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PSII structure and function. *Physiologia Plantarum* 110: 286-292. 2000.

REES, L. P.; MINNEY S. F.; PLUMMET, N. T.; SLATER, J. H. & SKYRME, D. A. A quantitative assessment of the antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9: 303-307. 1993.

REINERO, A. & BEACHY, R. N. Reduced photosystem II activity and acumulation of viral coat protein in chloroplasts of leaves infected with *Tobacco mosaic virus*. *Plant Physiology* 89: 111-116. 1989.

RESENDE, F. V.; SOUZA, R. J. & PASQUAL, M. Comportamento, em condições de campo, de plantas de alho obtidas por cultura de meristemas. *Horticultura Brasileira* 13: 44-46. 1995.

ROWLAND, D. DORNER, J.; SORENSEN, R.; BEASLEY JR, J. P. & TODD, J. *Tomato spotted wilt virus* in peanut tissue types and physiological effects related to disease incidence and severity. *Plant Pathology* 54: 431-440. 2005.

RODRIGUES, J. C. M.; SOUZA, M.L. DE; O'REILLY, D.; VELLOSO, L.M.; PINEDO, F. J. R.; RAZUCK, F.B.; RIBEIRO, B. & RIBEIRO, B. M. Characterization of the Ecdysteroid UDP-Glucosyltransferase (*egt*) Gene of *Anticarsia gemmatalis* Nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes* 22:1, 103-112. 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATS, T. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. In: Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniats T. (Eds). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. pp. 9.16-9.19.

SAMPOL, B.; BOTA, J.; RIERA, D.; MEDRANO, H. & FLEXAS, J. Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New Phytologist* 160: 403-412. 2003.

SANCHEZ-NAVARRO, J. A.; APARÍCIO, F.; ROWHANI, A. & PALLÁS, V. Comparative analysis of Elisa, nonradioactive molecular hybridization and PCR for the detection of *Prunus necrotic ringspot virus* in herbaceous and *Prunus* host. *Plant Pathology* 47: 780-786. 1998.

SHAAD, N. W.; FREDERICK, R. D.; SHAW, J.; SHNEIDER, W. L.; HICKSON, R.; PETRILLO, M. D. & LOUSTER, D. G. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annual Review of Phytopathology* 41: 305-324. 2003.

SHAHRAEEN, N. LESEMANN, D. E & GHOTBI, T. Survey for viruses infecting onion, garlic and leek crops in Iran. *Bulletin OEPP/EPPO* 38: 131-135. 2008.

SHALITIN, D. & WOLF, S. *Cucumber mosaic virus* infection affects sugar transport in melon plants. *Plant Physiology* 123: 597-604. 2000.

SHANNON, J.C. A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* kernels. *Purdue University Agricultural Experimental Station Research Bulletin* 842: 1-8. 1968.

SHIBOLETH, Y. M.; GAL-ON, A.; KOCH, M.; RABINOWITCH, H. D. & SALOMON, R. Molecular characterisation of *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) infecting garlic (*Allium sativum* L.) in Israel: Thermotherapy inhibits virus elimination by meristem tip culture. *Annual Applied of Biology* 138: 187-195. 2001.

SIEFERMANN-HARMS, D. Light and temperature control of season dependent

changes in the alpha and beta carotene content of *Spruce* needles. *Journal of Plant Physiology* 4: 488-494.1994.

SILVA da, J. L. & ALVARENGA, M. A. R. Efeito do choque frio sobre algumas características agrônômicas do alho Chonan. II- Características fisiológicas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 20: 1051-1059. 1985.

STURHAN, D. & BRZESKI, M. W. Stem and bulbs nematodes, *Ditylenchus* spp. In: Nickie, W. R. (Eds.). *Manual of Agricultural Nematology*. New York, Marcel Dekker, 1991. pp 423-464.

SWIECH, R.; BROWNING, S.; MOLSEN, D.; STENGER, D. C. & HOLBROOK, G. P. Photosynthesis responses of sugar beet an *Nicotiana benthamiana* Domin. infected with *Beet curly top virus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58: 43-52. 2001.

TAIWO, A. M.; KAREEM, K. T.; NSA, I. Y; HUGHES D'A. J. Cowpea viruses: Effect of single and mixed infections on symptomatology and virus concentration. *Virology Journal* 4:95. 2007.

TAIZ, L. & ZAIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 4^o Ed. Artmed. Porto Alegre, RS. 2006. 819 p.

TAKAICHI, M.; YAMAMOTO, M.; NAGAKUBO, T. & OEDA, K. Four garlic viruses identification by reverse transcription- polymerase chain reaction and their regional distribution in northern Japan. *Plant Disease* 82: 694-698. 1998.

TAKAICHI, M.; NAGAKUBO, T. & OEDA, K. Mixed virus infection of garlic determination by multivalent polyclonal antiserum and virus effects on disease symptoms. *Plant Disease* 85: 71-75. 2001.

TAKAKI, F.; SANO, T.; YAMASHITA, K.; FUJITA, F.; UEDA, K. & KATO, T. Complete nucleotide sequences of attenuated and severe isolates of *Leek yellow stripe virus* from garlic in northern Japan: Identification of

three distinct virus types in garlic and leek world-wide. Archives of Virology 150:1135-1149. 2005.

TANABE, C. M. N. Avaliação da degenerescência em campo causada por fitovirose na cultura de alho (*Allium sativum* L.). Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília. Brasília. 1999. 91p.

TENENTE, R. C. V.; VIANELLO, R. P.; PINHEIRO, F. P. Reprodução de *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936 em diferentes plantas hospedeiras no Brasil. Nematologia Brasileira 24: 87-90. 2000.

THOMSON, D. & DIETZGEN, R. G. Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. Journal of Virological Methods 54: 85-95. 1995.

TORRES A. C.; FAJARDO, T. V. M.; DUSI, A. N. & RESENDE, R. O. Shootip culture and thermotherapy in recovering virus free plants of garlic. Horticultura Brasileira 3: 192-195. 2000.

TSUNEYOSHI, T.; MATSUMI, T.; NATSUAKI, T. & SUMI, S. Nucleotide sequence analysis of virus isolates indicates the presences of three potyvirus species in *Allium* plants. Archives of virology 143: 97-113. 1998.

VAN DER PLANK, J. E. Plant Disease: Epidemics and control. New York: Academic Press, 1966. 349p.

VAN DIJK, P. Survey and characterization of potyviruses and their strains of *Allium* species. Netherlands Journal of Plant Pathology 99: 1-48. 1993.

VERWOED, T. C.; DEKKER, B. M. M. & HOEKEMA, A. A small scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. Nucleic Acids Research 17: 2362. 1989.

WALKEY, D. G. A. & ANTILL, D. N. Agronomic evaluation of viruses-free and virus-infected garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Horticultural Science* 64: 53-60. 1989.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of Chlorophylls *a* e *b*, as well as total carotenoides, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307-313. 1994.

WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; EL GHAOUTH, A. & WISNIEWSKI, M. E.. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81: 204-210. 1997.

WOLF, S.; OLESINKI, S. S.; BALACHANDRAN, W. J. & LUCAS, W. J. Movement protein expression and carbohydrate partitioning. In: Madore, M. A. & Lucas, W. J. (Eds.). *Carbon partitioning and source-sink interactions in plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD, 1995. pp. 117-129.

YOSHIDA, S.; KASUGA, S.; HAYASHI, N.; USHIROGUCHI, T.; MATSUURA, H. & NAKAGAWA, S. Antifungal activity of ajoene derived from garlic. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 615-617. 1987.

ZADOSK, J. C. On the conceptual basis of crop loss assessment the threshold theory. *Annual Review of Phytopathology* 23: 455-473. 1985.

ZECHMANN, B.; MÜLLER, M. & ZELLNIG, G. Cytological modifications in *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)-infected Styrian pumpkin plants. *Archives of Virology* 148: 1119-1133. 2003.

ZERBINI, F. M. & MACIEL-ZAMBOLIM, E. A família *Potyviridae*- parte I. In: Luz, W. C. (Ed.) *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 7: 1-66. 1999.

ZERBINI, F. M. & MACIEL-ZAMBOLIM, E. A família *Potyviridae*- parte II.
In: Luz, W. C. (Ed.) Revisão Anual de Patologia de Plantas 8: 225-265.
2000.

ANEXO: Tab. 1. Detalhamento da ocorrência das espécies do complexo viral do alho (*Allium sativum*) em quatro regiões brasileiras.

Região	Município	Sistema Produtivo	Propriedade	Código	Cultivar	Prevalência Viral						
						Bulbilho	OYDV	LYSV	GarCLV	GarV-C	GarV-D	GarMbFV
GO	Cristalina	ANVGP	Faz. Rio Preto	GO1	Ito	1	+	-	-	-	-	-
						2	+	-	-	-	-	+
						3	+	-	-	-	-	-
						4	+	-	-	-	-	-
						5	-	+	-	-	-	-
						6	-	+	-	-	-	-
						7	-	-	-	-	-	+
						8	-	-	-	-	-	+
GO	Cristalina	ANVGP	Faz. St. Bárbara	GO2	Chonan	1	-	-	-	-	-	-
						2	-	+	-	-	-	-
						3	-	+	-	-	-	-
						4	-	+	-	-	-	-
						5	-	+	-	-	-	-
						6	-	+	-	-	-	-
						7	-	+	-	-	-	-
						8	-	+	-	-	-	-
						9	-	+	-	-	-	-
						10	-	+	-	-	-	-
						11	-	+	-	-	-	-
						12	-	+	-	-	-	-
						13	-	+	-	-	-	-
GO	Cristalina	ANVGP	Faz. Lírio	GO3	Ito	1	-	-	-	-	-	
						2	-	+	-	-	-	-
						3	-	-	-	-	-	-

						4	-	+	-	-	-	-
						5	-	-	-	-	-	-
						6	-	-	+	-	-	-
						7	-	-	+	-	-	-
						8	-	-	+	-	-	-
						9	-	-	-	-	-	-
						10	-	-	-	-	-	-
						11	-	-	+	-	-	-
						12	-	-	-	-	-	-
						13	-	-	-	-	-	-
						14	-	-	-	-	-	-
						15	-	-	-	-	-	-
						1	-	-	-	-	-	-
						2	-	-	-	-	-	-
						3	-	-	-	-	-	-
						4	-	-	-	-	-	-
						5	-	-	-	-	-	-
						6	-	-	-	-	-	-
GO	Cristalina	ANVGP	Faz. Rio Preto	GO4	Caçador	7	+	-	-	-	-	-
						8	-	-	-	-	-	-
						9	-	+	-	-	-	-
						10	-	+	-	-	-	+
						11	-	+	-	-	-	+
						12	-	+	-	-	-	-
						13	-	+	-	-	-	+
						14	-	-	-	-	-	-
						15	-	-	-	-	-	-
GO	Cristalina		Faz. Lírio	GO5	Jonas	1	-	+	-	-	-	-

						2	-	+	-	-	-	-
						3	-	+	+	-	-	-
						4	-	+	+	-	-	-
						5	-	-	-	-	-	-
		ANVGP				6	-	+	-	-	-	-
						7	-	+	-	-	-	-
						8	-	-	-	-	-	-
						9	-	-	-	-	-	-
						10	-	-	-	-	-	-
						11	-	-	-	-	-	-
						12	-	-	-	-	-	-
						1	-	+	-	-	-	+
						2	-	+	-	-	-	-
						3	+	+	-	-	-	+
						4	-	-	-	-	-	-
						5	-	-	-	-	-	+
						6	-	-	-	-	-	+
						7	-	-	-	-	-	+
GO	Cristalina	ANVGP	Faz. Lírio	GO6	Quitéria	8	-	-	-	-	-	+
						9	-	+	-	-	-	+
						10	-	-	-	-	-	+
						11	-	-	+	-	-	+
						12	-	+	-	-	-	+
						13	-	-	-	-	-	-
						14	-	+	-	-	-	-
						15	-	-	+	-	-	-
						16	-	-	+	-	-	-
GO	Cristalina		Faz. Lírio	GO7	Caçador	1	-	+	-	-	-	-

						2	-	+	-	-	-	-
						3	-	+	-	-	-	-
						4	-	+	-	-	-	-
						5	-	+	-	-	-	-
						6	-	-	-	-	-	-
		ANVGP				7	-	+	-	-	-	-
						8	-	+	-	-	-	-
						9	+	-	-	-	-	-
						10	-	-	-	-	-	-
						11	-	-	-	-	-	-
						12	-	+	-	-	-	-
<hr/>												
						1	-	+	-	+	-	+
						2	-	+	-	+	-	+
						3	-	+	-	-	-	-
						4	-	+	-	-	-	-
						5	-	+	-	-	-	-
GO	Cristalina					6	-	-	-	-	-	-
		ANVGP	Faz. Lírio	GO8	Chonan	7	-	-	-	-	-	-
						8	-	-	-	-	-	-
						9	-	-	-	-	-	-
						10	-	+	-	-	-	-
						11	-	-	-	-	-	-
						12	-	-	-	-	-	-
<hr/>												
						1	-	+	-	-	-	+
						2	-	+	-	+	-	-
MG	Francisco Sá	ACLV	Faz. Tábuas	MG19	Cateto Roxo	3	-	-	-	-	-	-
						4	-	-	-	-	-	-
						5	-	+	-	-	-	-

						6	-	+	-	+	-	+
						7	-	+	-	+	-	-
						8	-	+	-	+	-	-
						9	-	+	-	+	-	+
						10	-	-	-	-	-	-
						1	+	-	-	-	-	-
						2	+	-	-	-	-	-
						3	+	+	+	-	-	+
						4	+	+	+	-	-	+
						5	+	-	-	-	-	+
						6	+	+	+	-	-	+
						7	+	+	+	-	-	+
MG	Francisco Sá	ACt	Faz. Traçadal	MG21	Cateto Roxo	8	+	-	-	-	-	+
						9	+	-	+	-	-	-
						10	+	-	-	-	-	-
						11	+	-	-	-	-	-
						12	+	+	+	-	-	+
						13	+	-	-	-	-	-
						14	+	-	-	-	-	-
						15	+	-	-	-	-	-
						1	-	-	-	-	-	-
						2	-	-	-	+	-	-
						3	-	-	-	+	-	-
MG	Francisco Sá	ACLV	Faz. Gameleira	MG22	Cateto Roxo	4	-	-	-	-	-	-
						5	-	-	-	-	-	+
						6	-	-	-	+	-	+
						7	-	-	-	+	-	+
MG	Francisco Sá		Faz.	MG23	Cateto Roxo	1	-	+	-	+	-	+

						Gameleira	2	-	+	-	-	-	-
							3	-	-	-	-	-	+
							4	-	-	-	-	-	-
							5	-	-	-	-	-	+
						ACLV	6	-	-	-	-	-	-
							7	+	-	-	-	-	+
							8	-	-	-	-	-	-
							9	-	-	-	-	-	+
							10	+	-	-	-	-	+
							11	-	-	-	-	-	-
							1	-	+	-	-	-	-
							2	-	+	-	-	-	-
							3	-	+	-	-	-	-
							4	-	+	-	-	-	-
							5	-	+	-	-	-	-
MG	Francisco Sá	ANVPP	Emater	MG24	Roxo Pérola de Caçador		6	-	+	-	-	-	-
							7	-	+	-	-	-	-
							8	-	+	-	-	-	-
							9	-	+	-	-	-	-
							10	-	+	-	-	-	-
							11	-	+	-	-	-	-
							1	-	-	-	-	-	-
							2	-	-	-	-	-	-
							3	-	-	-	-	-	+
MG	São Gotardo	ANVGP	Sekita Agronegócios	MG35	Ito Sul		4	-	-	-	-	-	-
							5	-	-	-	-	-	-
							6	-	-	-	-	-	-
							7	-	-	-	-	-	-

						8	-	-	-	-	-	-
						9	-	+	-	-	-	-
						10	-	+	-	-	-	-
						1	-	-	-	-	-	-
						2	-	-	-	-	-	-
						3	-	-	-	-	-	-
						4	-	-	-	-	-	-
MG	São Gotardo	ANVGP	Sekita Agronegócios	MG36	Ito Supremo	5	-	+	-	-	-	-
						6	-	+	-	-	-	-
						7	-	-	-	-	-	-
						8	-	+	-	-	-	-
						9	-	+	-	-	-	-
						10	-	-	-	-	-	-
						1	-	-	-	-	-	-
						2	-	-	-	-	-	-
						3	-	-	-	-	-	-
						4	-	-	-	-	-	-
MG	São Gotardo	ANVGP	Suguiana	MG37	Ito Supremo	5	-	-	-	-	-	-
						6	-	-	-	-	-	-
						7	-	-	-	-	-	-
						8	-	-	-	-	-	-
						9	-	-	-	-	-	-
						10	-	-	-	-	-	-
						1	-	-	-	-	-	-
						2	-	-	-	-	-	-
MG	São Gotardo	ANVGP	Sekita Agronegócios	MG38	Ito	3	-	-	-	-	-	-
						4	-	-	-	-	-	-
						5	-	+	-	-	-	-

						6	-	+	-	-	-	-
						7	+	+	-	-	-	-
						1	-	-	-	-	-	-
						2	-	-	-	-	-	-
						3	-	-	-	-	-	-
						4	-	-	-	-	-	-
MG	São Gotardo	ANVGP	Jorge Fukuda	MG39	São Valentino	5	-	-	-	-	-	-
						6	-	-	-	-	-	-
						7	-	-	-	-	-	-
						8	-	-	-	-	-	-
						9	-	-	-	-	-	-
						10	-	-	-	-	-	-
						1	-	-	-	-	-	-
						2	-	-	-	-	-	-
						3	-	-	-	-	-	-
						4	-	-	-	-	-	-
MG	São Gotardo	ANVGP	Jorge Fukuda	MG40	Ito	5	-	-	-	-	-	-
						6	-	-	-	-	-	-
						7	-	-	-	-	-	-
						8	-	-	-	-	-	-
						9	-	-	-	-	-	-
						10	-	-	-	-	-	-
						1	+	+	-	-	-	-
						2	+	-	-	-	-	-
BA	Boninal	ACLV	Comunidade do CEO	BA26	Cateto Roxo	3	+	+	-	-	-	-
						4	+	-	-	-	-	-
						5	-	+	-	-	-	-
						6	-	+	-	-	-	-

						7	-	-	-	-	-	-
						8	+	+	-	-	-	-
						1	-	-	-	+	-	-
						2	-	-	-	-	-	-
						3	-	-	-	-	-	-
						4	-	-	-	+	-	-
						5	-	-	-	+	-	-
BA	Brejinhos	ACLV	Faz. Boa Esperança	BA28	Cateto Roxo	6	-	-	-	+	-	-
						7	-	-	+	+	-	-
						8	-	-	-	+	-	-
						9	-	-	-	+	-	-
						10	-	-	-	+	-	-
						11	-	-	-	+	-	-
						12	-	-	-	-	-	-
						1	-	+	-	-	-	-
						2	-	-	-	-	-	-
						3	-	+	-	-	-	-
						4	-	+	-	-	-	-
BA	Caatinga do Moura/ Jacobina	ANVPP	Faz. Olhos D'Água	BA14	Roxo Pérola de Caçador	5	-	+	-	-	-	-
						6	-	+	-	-	-	-
						7	-	+	-	-	-	-
						8	-	+	-	-	-	-
						9	-	+	-	-	-	-
						10	-	+	-	-	-	-
BA	Caatinga do Moura/ Jacobina	ACLV	Faz. Boa Vista	BA12	Amarante	1	+	+	-	-	+	-
						2	+	+	-	-	+	-
						3	+	+	-	-	-	-

						4	-	+	-	-	+	-
						5	+	+	-	-	-	-
						6	-	+	-	-	+	-
						7	-	+	-	-	-	-
						8	-	+	-	-	-	-
						1	-	-	-	-	-	-
						2	-	-	-	-	-	-
						3	-	-	-	-	-	-
						4	-	-	-	-	-	-
BA	Cristópolis	ACLV	Cerquinha	BA29	Cateto Roxo	5	-	-	-	-	-	-
						6	-	-	-	-	-	-
						7	-	-	-	-	-	-
						8	-	-	-	-	-	-
						9	+	-	-	-	-	-
						10	+	-	-	-	-	-
						1	-	+	-	+	-	+
						2	-	+	-	+	-	+
						3	-	+	-	+	-	-
						4	-	+	-	-	-	+
						5	-	+	-	+	-	+
						6	-	-	-	+	-	-
BA	Cristópolis	ACt	Sítio Hermenegildo	BA30	Cateto Roxo	7	-	+	-	+	-	-
						8	-	+	-	+	-	+
						9	-	+	-	+	-	+
						10	-	+	-	+	-	+
						11	-	-	-	+	-	+
						12	-	-	-	+	-	+
						13	-	+	-	+	-	+

						14	-	+	-	+	-	-
						15	-	+	-	+	-	-
						1	-	-	-	-	-	-
						2	-	-	-	-	-	-
						3	-	-	-	-	-	-
						4	-	-	-	-	-	-
BA	Taquarendi/ Mirangaba	ACLV	Faz. Mandacaru	BA25	Cateto Roxo	5	-	-	-	+	-	+
						6	-	-	-	+	-	-
						7	-	-	-	-	-	-
						8	-	-	-	-	-	-
						9	-	-	-	-	-	-
						1	-	+	+	-	-	-
						2	-	+	-	-	-	-
						3	-	+	-	-	-	-
BA	Taquarendi/ Mirangaba	ANVPP	Faz. Canavieira	BA27	Caçador	4	-	+	+	-	-	-
						5	-	+	+	-	-	-
						6	-	+	+	-	-	-
						7	-	+	+	-	-	-
						8	-	+	-	-	-	-
						1	-	-	-	+	-	-
						2	-	-	-	+	-	+
						3	-	-	-	+	+	+
						4	-	-	-	+	+	-
BA	Taquarendi/ Mirangaba	ACLV	Faz. Canavieira	BA31	Cateto Roxo	5	-	-	-	+	+	-
						6	-	-	-	+	+	-
						7	-	-	-	+	-	-
						8	-	-	-	+	-	+
						9	-	-	-	+	-	+

						10	-	-	-	-	-	+
BA	Taquarendi/ Mirangaba	ANVPP	Faz. Mandacaru	BA09	Roxo Pérola de Caçador	1	+	+	-	-	-	-
						2	-	+	-	-	-	-
						3	+	+	-	+	-	-
						4	-	+	-	+	-	-
						5	+	+	-	+	-	-
						6	-	+	-	+	-	-
						7	+	+	-	+	-	-
						8	-	+	-	+	-	-
						9	+	+	-	-	-	-
						10	-	+	-	-	-	-
BA	Taquarendi/ Mirangaba	ACLV	Faz. Mandacaru	BA10	Amarante	1	-	-	-	-	-	+
						2	-	-	-	-	-	-
						3	-	-	-	-	-	-
						4	-	-	-	-	-	-
						5	-	-	-	-	-	-
BA	Taquarendi/ Mirangaba	ACLV	Faz. Caetano	BA11	Cateto Roxo	1	-	-	-	-	-	-
						2	-	-	-	-	-	-
						3	-	-	-	-	-	-
						4	-	-	-	-	-	-
						5	-	-	-	-	-	-
						6	+	-	-	-	-	-
						7	-	-	-	-	-	-
						8	-	-	-	-	-	-
						9	+	+	-	-	-	-

						10	-	-	-	-	-	-
BA	Taquarendi/ Mirangaba	ACLV	Faz Mandacaru	BA13	Amarante	1	-	-	-	-	-	-
						2	-	-	-	-	-	-
						3	-	-	-	-	-	-
						4	-	-	-	-	-	-
						5	-	-	-	-	-	-
						6	-	-	-	-	-	-
						7	+	-	-	-	-	-
RS	Flores da Cunha	ANVPP	Prop. Agenor	RS15	S/I	1	-	-	-	-	-	-
						2	-	-	-	-	-	-
						3	-	-	-	-	-	-
						4	-	+	-	-	-	-
						5	-	-	-	-	-	-
						6	-	-	-	-	-	-
						7	-	-	-	-	+	-
RS	Flores da Cunha	ANVPP	Prop. Marcelo	RS16	Quitéria	1	-	+	-	-	-	-
						2	-	+	-	-	-	-
						3	-	-	-	-	-	-
						4	-	-	-	-	-	-
						5	-	-	-	-	-	-
						6	-	-	-	-	-	-
						7	-	-	-	-	-	-
RS	Flores da Cunha	ANVPP	Prop. Rafael Carlin	RS17	Chonan	1	-	+	-	-	-	-
						2	-	+	-	-	-	-
						3	-	-	-	+	-	-

						4	-	-	+	-	-	-
						5	-	-	+	-	-	-
						6	-	-	-	-	-	-
						7	-	-	-	-	-	-
						8	-	-	-	-	-	-
						1	-	-	-	-	-	-
						2	-	+	-	+	-	-
						3	-	+	-	+	-	-
RS	Flores da Cunha	ANVPP	Prop. Orildo	RS18	Roxo Pérola de Caçador	4	-	+	-	+	-	-
						5	-	+	-	+	-	-
						6	-	+	-	+	-	-
						7	+	+	-	+	-	-
						1	-	-	-	-	-	-
						2	-	-	-	-	-	-
						3	-	-	-	-	-	-
						4	-	-	-	-	-	-
RS	Flores da Cunha	ANVPP	Prop. Márcio Slavieiro	RS20	Roxo Pérola de Caçador	5	-	-	-	-	-	-
						6	-	-	-	-	-	-
						7	-	-	-	-	-	-
						8	-	-	-	-	-	-
						9	-	-	-	-	-	-
Total						368	45	150	24	58	10	40

Onion yellow dwarf virus (OYDV); *Leek yellow stripe virus* (LYSV); *Garlic common latent virus* (GarCLV); *Garlic virus C* (GarV-C); *Garlic virus D* (GarD); *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV). Faz.: Fazenda. Prop.: Proprietário.

