

Análise da presença de vírus em alho semente da segunda e quarta gerações, produzidos por termoterapia e cultura de tecido

Milena Leite de Oliveira^{1*}, João Paulo Calore Nardini¹, Bruno Rossito De Marchi¹, Tatiana Mituti¹, Daiana Bampi¹, Marcelo Agenor Pavan¹, Renate Krause-Sakate¹.

¹UNESP- Faculdade de Ciências Agrônômicas, Departamento de Proteção Vegetal, Rua José Barbosa de Barros, 1780, CEP 18.610-307, Botucatu, SP. *Bolsista FAPESP/ Mestrado

Autor para correspondência: Renate Krause Sakate (renatekrause@fca.unesp.br)

Data de chegada: 17/04/2013. Aceito para publicação em: 03/02/2014.

1885

RESUMO

Oliveira, M. L.; Nardini, J. P. C.; De Marchi, B. R.; Mituti, T.; Bampi, D.; Pavan, M. A.; Krause-Sakate, R.. Análise da presença de vírus em alho semente da segunda e quarta gerações, produzidos por termoterapia e cultura de tecido. *Summa Phytopathologica*, v.40, n.1, p.75-77, 2014.

O alho (*Allium sativum* L.) pode estar naturalmente infectado por um complexo de vírus filamentosos pertencentes aos gêneros *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus*. O acúmulo destes vírus se dá, principalmente, pela sua propagação vegetativa através dos bulbilhos. Como a planta de alho cultivada não produz semente verdadeira em todo o mundo, a única forma de se obter plantas livres de vírus se dá pela cultura de tecidos dos ápices caulinares e termoterapia. Utilizando estas técnicas, alhos sementes foram produzidos na FCA- UNESP de Botucatu e avaliados via RT-PCR para a presença de potyvirus, carlavirus e allexivirus. Na segunda geração dos microbulbilhos propagados em casa de vegetação, 6,6% de infecção foi verificada por allexivirus. Já na quarta geração foi observada incidência de 60% com allexivirus, 35% com potyvirus e todas foram negativas para

carlavirus. A alta taxa de infecção por allexivirus pode estar relacionada à maior dificuldade de remoção de espécies de vírus pertencentes a este gênero, como também já observado por outros autores, pela infecção e transmissão de vírus pelo ácaro, *Aceria tulipae*, durante o armazenamento dos bulbos de um ano a outro. O alho na quarta geração corresponde a bulbilhos com peso inferior a 1 grama e que não haviam sido selecionados para multiplicação comercial. A seleção para tamanho do bulbilho tem efeito positivo na escolha de bulbilhos com menores taxas de infecção por vírus, já que a técnica de termoterapia e cultura de tecidos não elimina totalmente os vírus. Os resultados também enfatizam a necessidade de se realizar fumigação no alho semente armazenado de um ano a outro a fim de evitar a transmissão de allexivirus durante o armazenamento.

Palavras-chave adicionais: *Allium sativum* L., *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus*

ABSTRACT

Oliveira, M. L.; Nardini, J. P. C.; De Marchi, B.R.; Mituti, T.; Bampi, D.; Pavan, M.A.; Krause-Sakate, R. Analysis of the presence of viruses in garlic seed produced by thermotherapy culture and tissue. *Summa Phytopathologica*, v.40, n.1, p.75-77, 2014.

The garlic (*Allium sativum* L.) can be naturally infected by a complex of filamentous viruses belonging to the genera *Potyvirus*, *Carlavirus* and *Allexivirus*. Accumulation of these viruses occurs especially by vegetative propagation through cloves. As the cultivated garlic plant does not produce true seed worldwide, virus-free plants can only be obtained by tissue culture of stem apices and thermotherapy. Using these techniques, garlic seeds were produced at the School of Agricultural Sciences - UNESP, Botucatu, and evaluated by RT-PCR for the presence of potyvirus, carlavirus and allexivirus. In the second generation of microcloves propagated in a greenhouse, 6.6% infection was detected, only by allexivirus. In the fourth generation, however, there was 60% incidence by allexivirus, 35% by potyvirus and all

negative by carlavirus. The high rate of infection by allexivirus may be related to the greater difficulty of removing the species of viruses belonging to this genus, as observed by other authors, and also based on the infection and transmission of the virus by the mite, *Aceria tulipae*, during the storage of bulbs from one year to the other. The garlic at the fourth generation corresponds to cloves weighed less than 1 gram and not selected for commercial multiplication. Selection for the size of cloves has a positive effect on the choice of cloves with lower rates of viral infection, as the technique of thermotherapy and tissue culture do not eliminate the virus completely. Results also emphasize the need of fumigation for the garlic seed stored from one year to the other in order to prevent the transmission of allexivirus during storage.

Additional keywords: *Allium sativum* L., *Potyvirus*, *Carlavirus* and *Allexivirus*.

O alho (*Allium sativum* L.) é propagado de forma vegetativa, prática que favorece o acúmulo de patógenos, principalmente os vírus que reduzem o rendimento da cultura. Plantas de alho mostrando sintomas de mosaico podem estar infectadas por diferentes espécies de vírus, isoladamente ou frequentemente em complexos formados por espécies do gênero *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus* (6). Estes vírus causam degeneração da planta, causando o amarelecimento, redução do crescimento e da produção. Qualquer que seja o vírus, a propagação vegetativa do alho é o principal mecanismo através do qual os vírus são perpetuados e disseminados para outras regiões.

Além da propagação vegetativa, os vírus podem ser transmitidos por afídeos vetores, como é o caso dos *Potyvirus* e *Carlavirus*; e os *Allexivirus* que podem ser transmitidos por ácaros, *Aceria tulipae* (5). No alho os pulgões não são considerados pragas da cultura (9), portanto, seu controle com inseticidas não é realizado. Para o gênero *Allexivirus*, o ácaro vetor é controlado através do tratamento por imersão dos bulbilhos em acaricidas antes do plantio (9) impedindo a transmissão destes vírus no campo. Portanto não há medidas efetivas de controle de doenças viróticas em alho, e sim medidas preventivas e gerais de manejo da cultura (4). Contudo a forma ideal para o controle dos vírus em alho é a obtenção de plantas livres de vírus para posterior propagação. Com isso, este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento criterioso da sanidade vegetal dos alhos produzidos na FCA- UNESP de Botucatu, através da associação de termoterapia e cultura de tecido.

O processo de obtenção de alho livre de vírus iniciou-se pelo tratamento de termoterapia com água quente, onde os bulbilhos foram submetidos a uma temperatura de 48° a 50°C por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, foi realizado o cultivo *in vitro* de ápices caulinares em meio sólido de Murashige e Skoog (1992), completando com o fitoregulador BA (6-benzilaminopurina) 2 mg/L. Durante três anos os microbulbilhos obtidos *in vitro* foram multiplicados em casa de vegetação e mantidos sob condições ambientais controladas. Durante esses anos, amostras de folhas de cada planta foram coletadas para indexação através de análises moleculares.

O alho-semente comprovadamente livre de vírus foi multiplicado sucessivamente por duas gerações em condições de telado e campo, numa região com altitude superior a 1000 metros e na ausência de plantio comercial próximo.

Cento e setenta e cinco plantas de alho mantidas em casa de vegetação foram coletadas para extração total de RNA (3) e utilizadas para análise por RT-PCR com oligonucleotídeos universais para os gêneros *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus* (tabela 1) usando PCR Master Mix Kit Gotaq Colorless (Promega) e AMV reverse transcriptase (*Avian myeloblastosis virus*). Em um volume final de 25 µl, 12,5 µL de PCR Master Mix 2X, 1 µM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de transcriptase reverse AMV (PROMEGA), 2,5 µL de RNA foi adicionado. As etapas do PCR

para o oligonucleotídeo universal de allexivirus foram 40 ciclos (94°C/40 s, 50°C/50 s e 72°C/40 s), para potyvirus foram 35 ciclos (94°C/ 30 s, 54°C/45 s e 72°C/55 s) e para carlavirus foram 40 ciclos (94°C /60 s, 50°C/60 s e 72°C/60 s). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese a 1,5% gel de agarose usando GelRed (Uniscience). As bandas amplificadas foram: 250 bp, 800 a 1000 bp e 360 bp, respectivamente.

Em 2010, bulbos de alho submetidos à termoterapia e cultura de tecido, em sua segunda geração, foram analisados para presença de potyvirus, allexivirus e carlavirus. Do total de 75 amostras de alho, 33 destas mantidas em telado anti-afídico na região de Guarapuava/PR e 42 em casa de vegetação em Botucatu-SP (fase de aclimatização), 5 foram positivas para presença de allexivirus, dos quais três amostras para a espécie *Garlic virus A* (GarV-A), uma para *Garlic virus C* (GarV-C) e uma para *Garlic virus D* (GarV-D). Nenhuma foi positiva para potyvirus e carlavirus. A porcentagem de plantas infectadas com allexivirus foi de 6,6%. Estes bulbilhos apresentavam peso superior a 1 grama, peso este desejável após aclimatização e foram selecionados para multiplicação comercial.

Em 2012, 100 plantas de alho, da quarta geração, mantidas em condições de casa de vegetação em Botucatu foram analisadas para a presença de vírus. Destas, 60% foram positivas para presença de allexivirus, 35% para potyvirus e todas negativas para carlavirus. A alta taxa de infecção por allexivirus e potyvirus pode ter duas explicações: 1º) Estes bulbilhos após aclimatização não foram inicialmente selecionados para multiplicação comercial por apresentarem peso inferior a 1 grama. Fica evidente que a seleção para tamanho do bulbo auxilia na escolha de bulbos com menores taxas de infecção por vírus, demonstrando escape durante a termoterapia e cultura de tecido; 2º) Outro fato importante a ser relatado é que a transmissão e disseminação do vírus pelo ácaro vetor, *A. tulipae*, pode ter ocorrido durante o armazenamento dos bulbos de um ano a outro. Barg et al. (1) evidenciaram que condições inadequadas de armazenamento de bulbos podem favorecer a proliferação de ácaros, que se desenvolvem sob as escamas dos bulbos e possibilitam a disseminação de vírus. No Brasil, a fumigação do alho semente não é uma prática rotineira, pois o produtor normalmente vende os alhos para consumo e utiliza no próximo plantio, as sementes que sobraram. Os resultados aqui obtidos evidenciam a necessidade de fumigação do alho armazenado para cultivo.

Autores verificaram que os allexivirus são mais difíceis de serem eliminados pela termoterapia e cultura de tecido em alho, Verbeek et al. (11) obtiveram eficiência de eliminação de somente 54% para allexivirus, enquanto que 100% para *Leek yellow stripe virus* (LYSV- potyvirus), 92% para *Onion yellow dwarf virus* (OYDV- potyvirus) e 62% para *Garlic common latent virus* (GarCLV- carlavirus).

A taxa de infecção por potyvirus (35%) verificada nas plantas da quarta geração indica escape do processo de limpeza por termoterapia e cultura de meristema. Estes resultados evidenciam a

Tabela 1. Oligonucleotídeos universais utilizados na detecção dos gêneros *Potyvirus* (8), *Carlavirus* (7) e *Allexivirus*.

Gêneros	Oligonucleotídeos	Sequências
<i>Potyvirus</i>	WCIE	5' ATGGTTTGGTGYATYGARAAT 3'
	PV1	5' GATTTAGGTGACACTATAGT (x16) 3'
<i>Carlavirus</i>	SLV/GCLV 7303	5' GGNTKKGAAWCTGGGAGDCC 3'
	SLV/GCLV 7665	5' CATKTMATCCAAACAACNGGYGC 3'
<i>Allexivirus</i>	Cpallexi-senso2	5' CTACCACAAAYGGNTCVTC 3'
	Cpallexi-anti1	5' CACNGCGTTRAAGAARTC 3'

necessidade de selecionar os bulbos maiores e mais vigorosos para multiplicação do alho, pois estes têm menor porcentagem de infecção por vírus. De acordo com Pavan (1998) uma alternativa, viável e com baixo custo, é a utilização de clones assintomáticos selecionados no campo de produção. Esses proporcionam maior capacidade de aclimatização, maior produtividade e melhor qualidade dos bulbos.

Na Argentina pesquisas constataram evidentes perdas na produção ocasionadas por allexivirus na cultivar Blanco-IFFIVE, mesmo quando as plantas estão com infecção simples por GarV-A. Para esta espécie foi verificada redução de peso dos bulbos de 14 a 32% e 6 a 11% no diâmetro dos bulbos. As perdas são fortemente acrescidas quando há infecção mista entre as diferentes espécies e principalmente entre vírus pertencentes a diferentes gêneros (3).

O tratamento por termoterapia e cultura de tecido empregado para produção de alho livre de vírus na FCA/UNESP-Botucatu é um método satisfatório na eliminação de vírus, porém possibilita escape principalmente de allexivirus e potyvirus. É necessário realizar sistematicamente testes para presença dos vírus durante a propagação do alho semente e aliada a termoterapia fazer a seleção positiva para os bulbos de maior tamanho, pois garantem menor infecção por vírus. A transmissão no armazenamento dos bulbos de um ano a outro, através do ácaro, *A. tulipae*, enfatiza a necessidade de métodos de armazenamento adequados e o uso de fumigantes no alho semente armazenado para evitar transmissão de allexivirus durante o processo de armazenamento. A utilização de inibidores virais também pode ser uma alternativa para reduzir as taxas de transmissão de vírus pela cultura de tecido que será avaliada em nosso laboratório.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP o auxílio concedido para a pesquisa (processo 2010/15370-0) e pela bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor. Marcelo Agenor Pavan e Renate Krause

Sakate são bolsistas do CNPq.

REFERÊNCIAS

1. Barg, E.; Lesemann, D. E.; Vetten, H. J.; Green, S. K. Viruses of alliums and their distribution in different Allium crops and geographical regions. *Acta Horticulturae*, Leuven, v. 433, p. 607-616, 1997.
2. Bertheau, Y.; Frechon, D.; Toth, I.K.; Hyman, L.J. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). In: Perombelon, M. C. M.; van der Wolff, J. M. **Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes**. Dundee: Scottish Crop Research Institute, 1998.
3. Cafrune, E. E.; Perotto, M. C.; Conci, V. C. Effect of two Allexivirus isolates on garlic yield. *Plant Disease*, St. Paul, v. 90, p. 898-904, 2006.
4. Fajardo, T.V.M.; Resende, R.O.; Maciel-Zambolim, E. Doenças causadas por vírus em alho e cebola. In: Zambolim, L.; Vale, F.X.R.; Costa, H. **Controle de doenças de plantas hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. p.103-129
5. King, A. M. K., Lefkowitz, E., Adams, M. J.; Carstens, E. B. **Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London: Elsevier, 2011. 1327 p.
6. Massola Júnior, N. S.; Jesus Júnior, W. C.; Kimati, H. Doenças do alho de da cebola (*Allium sativum* e *A. cepa*). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Camargo, L. E. A. (Ed.) **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. V. 2. Cap. 9, p. 53-63.
7. Mituti, T. **Levantamento das principais viroses na cultura do alho (*Allium sativum* L.) e caracterização de carlavirus em algumas regiões produtoras do Brasil**. 2009. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)- Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
8. Mota, L.D.C.; Della Vecchia, M.G.S.; Gioria, R.; Kitajima, E.W.; Rezende, J.A.M.; Camargo, L.E.A.; Amorim, L. *Pfaffia mosaic virus*: a new potyvirus found infecting *Pfaffia glomerata* in Brazil. *Plant Pathology*, London, v. 53, p. 368-373, 2004.
9. Murashige, T.; Skoog, F. A resived medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Malden, v. 15, p. 473-496, 1962.
10. Verbeek, M.; Dijk, P. V.; Peter, M. A. Efficiency of eradication of four viruses from garlic (*Allium sativum*) by meristem-tip culture. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v.101, p.231-239, 1995.