

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DE ALLEXIVIRUS EM ALHO NAS REGIÕES  
SUL, SUDESTE E CENTRO-OESTE BRASILEIRO E ANÁLISE DA  
SANIDADE VEGETAL DO ALHO OBTIDO POR CULTURA DE  
MERISTEMA E TERMOTERAPIA NA FCA/UNESP**

**MILENA LEITE DE OLIVEIRA**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP- Campus de  
Botucatu, para obtenção do Título de Mestre  
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP

Fevereiro - 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DE ALLEXIVIRUS EM ALHO NAS REGIÕES  
SUL, SUDESTE E CENTRO-OESTE BRASILEIRO E ANÁLISE DA  
SANIDADE VEGETAL DO ALHO OBTIDO POR CULTURA DE  
MERISTEMA E TERMOTERAPIA NA FCA/UNESP**

**MILENA LEITE DE OLIVEIRA**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renate Krause Sakate

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP- Campus de  
Botucatu, para obtenção do Título de Mestre  
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP

Fevereiro -2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

O49c Oliveira, Milena Leite de, 1985-  
Caracterização de allexivirus em alho nas regiões sul, sudeste e centro-oeste brasileiro e análise da sanidade vegetal do alho obtido por cultura de meristema e termoterapia na FCA/UNESP / Milena Leite de Oliveira. - Botucatu : [s.n.], 2013  
x , 59 f.: il., color, grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2013  
Orientador: Renate Krause Sakate  
Co-orientador: Marcelo Agenor Pavan  
Inclui bibliografia

1. Alho. 2. Virus RNA. 3. Virus de plantas. 4. Termoterapia. I. Sakate, Renate Krause. II. Pavan, Marcelo Agenor III. Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

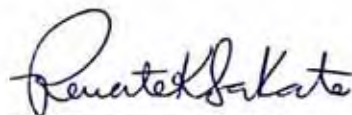
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU  
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO DE ALLEXIVIRUS EM ALHO NAS REGIÕES SUL,  
SUDESTE E CENTRO-OESTE BRASILEIRO E ANÁLISE DA SANIDADE  
VEGETAL DO ALHO OBTIDO POR CULTURA DE MERISTEMA E  
TERMOTERAPIA"

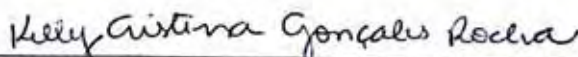
ALUNA: MILENA LEITE DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE  
COORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN

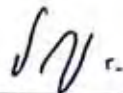
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE



PROFA. DRA. KELLY CRISTINA GONÇALES ROCHA



DR. VALDIR ATSUSHI YUKI

Data da Realização: 26 de fevereiro de 2013.

Aos meus pais, **Rita e Ademir**, por dedicarem suas vidas à educação e formação de seus filhos, além do apoio, de todo amor e carinho.

Aos meus queridos avós, **Antônio Brasília e Elza**, pela participação em mais uma nova etapa da minha vida.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho, e em especial:

- A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Renate Krause Sakate**, pela sua excelente orientação, ensinamentos, apoio e dedicação, um exemplo de profissionalismo e amizade, representando fundamental importância no desenvolvimento do trabalho;

- Ao Prof. Dr. **Marcelo Agenor Pavan**, meu co-orientador, pelos ensinamentos e orientação.

- Ao **José Marcelo Soman**, meu companheiro e amigo de todos os momentos, que esteve sempre ao meu lado, pelo amor, carinho, apoio e incentivo.

- À **Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP** – Campus de Botucatu e em especial ao Curso de Pós Graduação em Agronomia- Área de Concentração Proteção de Plantas, que permitiram a realização do curso de Pós Graduação;

- À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo auxílio financeiro concedido, permitindo assim a realização deste trabalho;

- Aos meus companheiros de laboratório, Letícia Aparecida de Moraes, Monika Fecury, Julio Marubayashi, Bruno Rossito De Marchi, Leonardo Barbosa Fonseca, Denise Nozaki, Kelly Rocha, Késsia Pantoja, Cristiane Melo, minha estagiária Isabel Hoffmann e todos aqueles que estiveram próximos a mim nestes anos de dedicação a pesquisa, em especial Tatiana Mituti, pela paciência e colaboração, mesmo estando distante.

- Aos professores Antonio Carlos Maringoni, Edson Luiz Furtado, Carlos Gilberto Raetano, Silvia Renata S. Wilcken, Luiz Carlos Luchini que contribuíram para a minha formação ao longo do curso.

- Aos meus professores da graduação, que muito contribuíram para minha formação acadêmica, pelos ensinamentos, pelo incentivo à pós-graduação.
  
- A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Peres de Oliveira pela amizade, apoio, por fazer parte e ter contribuído para que essa conquista se realizasse.
  
- E acima de todas as coisas agradeço a **Deus** pela oportunidade de avançar os meus estudos e pela conquista dessa mais nova vitória.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
1. RESUMO.....	01
2. SUMMARY.....	03
3. INTRODUÇÃO.....	05
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	07
4.1 Aspectos gerais da cultura do alho.....	07
4.2 Produção.....	08
4.3 Virus em alho.....	09
4.3.1 Gênero <i>Potyvirus</i> .....	09
4.3.2 Gênero <i>Carlavirus</i> .....	11
4.3.3 Gênero <i>Allexivirus</i> .....	12
4.2 Sintomatologia.....	13
4.3 Transmissão.....	13
4.4 Diagnose dos vírus em alho.....	14
4.5 Controle.....	15
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
5.1 Coletas de amostras de alho.....	17
5.2. Extração de RNA total.....	19
5.3. Transcrição reversa e Reação de Polimerização em Cadeia (RT-PCR).....	20
5.3.1. Obtenção de oligonucleotideo universal para <i>Allexivirus</i> .....	20
5.3.2. Utilização de oligonucleotideos descritos em literatura.....	21
5.3.3. Obtenção de oligonucleotideos específicos para <i>Garlic virus B</i> .....	21
5.3.4. Obtenção de oligonucleotideos para espécies exóticas de <i>Allexivirus</i> .....	22
5.4. Clonagem dos fragmentos em vetor pGEM-T Easy.....	23
5.5. Análise da sanidade vegetal do alho livre de vírus produzidos na FCA.....	24
5.6. Sequenciamento e análise.....	24
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
6.1. Teste de eficiência dos oligonucleotideos obtidos.....	25
6.1.1. Oligonucleotideos universais para <i>Allexivirus</i> .....	25
6.1.2. Oligonucleotídeos específicos para <i>Garlic virus B</i> .....	26



6.1.3. Oligonucleotídeos específicos para <i>Garlic virus X</i> .....	26
6.1.4. Oligonucleotídeos específicos para <i>Garlic virus E</i> e <i>Shallot virus X</i> .....	26
6.2. Análise das amostras coletadas.....	27
6.3. Análise da variabilidade genética dos isolados.....	29
6.4. Análise da sanidade vegetal de bulbos de alho submetidos à termoterapia e cultura de tecido.....	42
7. CONCLUSÕES.....	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
APÊNDICE 1.....	51
APÊNDICE 2.....	54
APÊNDICE 3.....	56
APÊNDICE 4.....	58

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
1. Período, número de amostras e localidade das plantas sintomáticas coletadas durante julho de 2010 a agosto de 2012.....	18
2. Sequências dos oligonucleotídeos universais para amplificação parcial da região codificadora da proteína capsidial de diferentes espécies pertencentes ao gênero <i>Allexivirus</i> em alho. CPallexi-senso2/CPallexi-anti1 amplificam um fragmento em torno de 237 bp.....	21
3. Sequências dos oligonucleotídeos para amplificação completa da região codificadora da proteína capsidial das espécies GarV-A, GarV-C, GarV-D (MELO et al., 2004) e GarMbFV (FAYAD-ANDRÉ et al., 2011).....	21
4. Sequências dos oligonucleotídeos obtidos para amplificação parcial e região completa codificadora para a proteína capsidial da espécie GarV-B. CPBS2/CPBA1 e GarV-BS1/GarV-BA2 amplificam um fragmento em torno de 430 bp e 980 bp respectivamente.....	22
5. Sequências dos oligonucleotídeos obtidos para amplificação parcial da região codificadora da proteína capsidial de espécies exóticas de allexivirus no Brasil.....	23
6. Oligonucleotídeos utilizados para detecção de vírus pertencentes aos gêneros <i>Carlavirus</i> e <i>Potyvirus</i> . WCIEN/PV1 foram descritos por Mota (2004) e SLV/GCLV 7303 e SLV/GCLV 7665 por Mituti (2009).....	24
7. Número de amostras de alho com infecção simples e mista entre GarV-A, GarV-B, GarV-C e GarV-D. Os dados de GarMbFV não foram contabilizados nessa tabela, pois das 348 amostras somente 239 foram analisadas.....	28
8. Número de amostras de alho com infecção simples e mista entre GarMbFV, GarV-A, GarV-B, GarV-C e GarV-D.....	29
9. Porcentagem de identidade de nucleotídeos da região codificadora para a proteína capsidial entre os isolados analisados de GarV-A (NC_003375.1; AF478197.1; AB010300.1; JN019812.1).....	32
10. Porcentagem de identidade de nucleotídeos para a região codificadora para a proteína capsidial entre isolados analisados de GarV-B (AB010301.1; AF543829.1; JN0198813.1).....	34
11. Porcentagem de identidade de nucleotídeos da região codificadora para a proteína capsidial entre os isolados analisados para GarV-C (AB010302.1;	

NC_003376.1).....	36
<b>12.</b> Porcentagem de identidade de nucleotídeos da região codificadora para a proteína capsidial entre os isolados analisados para GarV-D (JN019815.1; AB010303.1; AF519572.1).....	38
<b>13.</b> Porcentagem de identidade de nucleotídeos para a região codificadora para a proteína capsidial entre isolados analisados de GarMbFV (X98991.1; AY390254.1).....	40

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1. Organização genômica da espécie <i>Tobacco etch virus</i> do gênero <i>Potyvirus</i> . Adaptado do Internacional Committee Taxonomy of Viruses (ICTV).....	10
2. Organização genômica da espécie <i>Carnation latent virus</i> do gênero <i>Carlavirus</i> .....	11
3. Organização genômica da espécie tipo do gênero <i>Allexivirus</i> , <i>Shallot virus X</i> .....	12
4. Plantas de alho com sintomas típicos de ataque de ácaro e infectadas por <i>allexivirus</i> .....	18
5. Folhas de alho apresentando infestação pelo ácaro <i>Aceria tulipae</i> .....	19
6. Gel de agarose a 0,8% com reações de RT-PCR com amostras positivas para <i>Allexivirus</i> utilizando oligonucleotídeo universal, e oligonucleotídeos específicos para GarV-B (CP parcial e CP completa) e GarV-X.....	27
7. Árvore Filogenética da sequência completa de nucleotídeos da proteína capsidial de isolados de GarV-A. A árvore foi construída pelo método neighbour-joining com o programa MEGA4.0 Bootstrap (2,000 replicatas).....	31
8. Árvore Filogenética da sequência completa de nucleotídeos região codificadora para a proteína capsidial de isolados de GarV-B. A árvore foi construída pelo método neighbour-joining com o programa MEGA4.0 Bootstrap (2,000 replicatas).....	33
9. Árvore filogenética gerada com a sequência completa de nucleotídeos da proteína capsidial de isolados de GarV-C. A árvore foi construída pelo método neighbour-joining com o programa MEGA4.0 Bootstrap (2,000 replicatas).....	35
10. Árvore filogenética gerada para a sequência completa de nucleotídeos da capa proteica para isolados brasileiros de GarV-D comparados com sequencias depositadas no GenBank. A árvore foi construída pelo método neighbour-joining com o programa MEGA4.0 Bootstrap (2,000 replicatas).....	37
11. Árvore Filogenética para a sequência completa de nucleotídeos codificadora para a proteína capsidial de isolados de GarMbFV. A árvore foi construída pelo método neighbour-joining com o programa MEGA4.0 Bootstrap (2,000 replicatas).....	39
12. Árvore Filogenética para a sequência parcial de nucleotídeos codificadora para a proteína capsidial de isolados GarV-X. A árvore foi construída pelo método neighbour-joining com o programa MEGA4.0 Bootstrap (2,000 replicatas).....	41

## 1. RESUMO

O alho é propagado através de bulbilhos, prática que favorece a transmissão, especialmente de vírus, dos quais pode-se citar os gêneros *Allexivirus*, *Carlavirus* e *Potyvirus*. As espécies pertencentes ao gênero *Allexivirus* são: *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B), *Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D), *Garlic virus E* (GarV-E), *Garlic virus X* (GarV-X), *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV) e *Shallot virus X* (ShVX). Entretanto, somente cinco destas espécies foram relatadas até o momento em alho no Brasil, o GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D e GarMbFV. A importância e ocorrência de cada um destes allexivirus foi estudada em alho nobre proveniente das regiões de Guarapuava, PR; Santa Juliana, MG; Cristalina, GO e Campo Alegre, GO; grandes regiões produtoras de alho nobre no Brasil e também em uma coleção de alho nobre e alho tropical mantida na Fazenda Experimental de São Manuel, SP da FCA/UNESP-Botucatu. Inicialmente a detecção foi realizada com um par de oligonucleotídeo universal, obtido neste trabalho, capaz de identificar as diferentes espécies de allexivirus seguida de detecção com oligonucleotídeos específicos para as espécies. Os resultados obtidos indicam a frequente ocorrência de infecções mistas entre espécies de allexivirus, com predominância do GarV-A e GarV-D. Das 348 amostras de alho analisadas, 89 estavam infectadas por GarV-A, 36 por GarV-B, 57 por GarV-C e 101 por GarV-D. Dentre o total de amostras analisadas, 239 foram testadas para a presença de GarMbFV e 24 foram positivas. Como havia amostras positivas para allexivirus, porém não identificadas para nenhuma das espécies testadas, oligonucleotídeos para espécies de allexivirus exóticas no Brasil, como o GarV-X, GarV-E e ShVX foram sintetizados e

testados. Foi possível detectar o GarV-X em amostras de alho provenientes das regiões de Santa Juliana (MG), Guarapuava (PR) e São Manuel (SP). A análise da região codificadora para a proteína capsidial do GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D e GarMbFV indica introduções destes vírus no Brasil possivelmente de diferentes regiões geográficas do mundo. O alho semente produzido por termoterapia e cultura de tecido na FCA-UNESP também foi avaliado por RT-PCR para presença de potyvirus, carlavirus e allexivirus. Em 2010 foi observada ocorrência de 6,6% de infecção por allexivirus em 75 amostras de alho em fase de aclimatização em estufas, correspondente à segunda geração após cultura de tecido. Não foi detectado potyvirus e carlavirus. Na quarta geração em casa de vegetação, em 2012, 100 plantas de alho foram analisadas e observou-se a incidência de 60% de 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 já observado por outros autores, porém também pela infecção e transmissão de vírus pelo ácaro, *Aceria tulipae*, durante o armazenamento dos bulbos de um ano a outro. Esta quarta geração corresponde a dentes que na segunda geração tinham peso inferior a 1 grama e não foram diretamente selecionados para multiplicação comercial. A seleção positiva para tamanho do dente contribuiu para seleção de clones com menor infecção viral. Os dados enfatizam a necessidade de acompanhamento constante do alho obtido por cultura de tecido e termoterapia para presença de vírus, pois a metodologia hoje estabelecida possibilita escape de vírus.

---

Palavras-chaves: Levantamento; Incidência; Infecção mista; *Garlic virus X*; Análise genética; Diagnose; Sequenciamento; Variabilidade.

**CHARACTERIZATION OF *Allexivirus* IN GARLIC FROM SOUTH, EAST AND WEST CENTRAL BRAZILIAN REGIONS AND ANALYSIS OF THE SANITY OF GARLIC OBTAINED BY TISSUE CULTURE IN FCA / UNESP.**

Botucatu, 2013. 59 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)- Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: Milena Leite de Oliveira

Adviser: Renate Krause Sakate

Co-Adviser: Marcelo Agenor Pavan

## **2. SUMMARY**

The garlic plant is propagated through the bulbs, practice which favors the transmission especially of viruses belonging to the genera *Allexivirus*, *Carlavirus* and *Potyvirus*. The species of the genus *Allexivirus* are: *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B), *Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D), *Garlic virus E* (GarV-E), *Garlic virus X* (GarV-X), *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV) and *Shallot virus X* (ShVX). However, only five of them have been reported in Brazil, GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D and GarMbFV. The occurrence and importance of each of these allexivirus were studied in the regions of Guarapuava, PR; Santa Juliana, MG; Cristalina, GO and Campo Alegre, GO; major producing regions of noble garlic in Brazil and also in a collection of noble garlic and tropical garlic maintained at the Experimental Farm of São Manuel, SP FCA / UNESP- Botucatu. Initially the detection was performed with a universal primer pair obtained in this work, capable of

identifying different species of allexivirus followed by detection with specific primers for the species. Mixed infections between different species of allexivirus were frequent, predominantly GarV-A and GarV-D. Among 348 samples, 89 were infected with GarV-A, 36 with GarV-B, 57 with GarV-C and 101 with GarV-D. Of all analyzed samples, 239 were tested for the presence of GarMbFV and 24 were positive. Primers for exotic species of allexivirus in Brazil, as GarV-X, GarV-E and ShVX were synthesized and tested in samples detected as positive by the universal primers but negative for GarV-A, GarV-B, GarV-C and GarV-D. It was possible to detect the GarV-X in garlic samples from the regions of Santa Juliana (MG), Guarapuava (PR) and São Manuel (SP). The analysis of the coding region for the capsid protein of GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D and GarMbFV indicates introductions of these viruses in Brazil possibly from different geographical regions of the world. Garlic seed produced by thermotherapy and tissue culture in UNESP FCA was also assessed by RT-PCR for the presence of potyvirus, carlavirus and allexivirus. In 2010, 75 garlic samples from the second generation after tissue culture were tested and 6.6% were infected by allexivirus. Carlavirus and potyvirus were not detected. In 2012, 100 garlic samples from the fourth generation maintained at the greenhouse were analyzed and an incidence of 60% by allexivirus and 35% by potyvirus observed. The high rate of infection by allexivirus may be related to the greater difficulty to remove allexivirus by tissue culture and termoterapy, as already noted by other authors, but also could be related to the transmission of these viruses by *Aceria tulipae* during storage of bulbs. This fourth generation corresponds to bulbs that weighed less than 1 grame at the second generation and they were not directly selected for commercial multiplication. A positive selection for size of bulbs contributes to selection of clones with lower viral infection. Garlic obtained by tissue culture and thermotherapy needs to be constantly evaluated for the presence of viruses since the methodology established today enables virus escape.

---

Key-words: Survey; Incidence; Mixed Infection; *Garlic virus X*; Genetic Analysis; Diagnose; Sequencing; Variability.



### 3. INTRODUÇÃO

O gênero *Allium* é um dos maiores gêneros de plantas, o qual inclui cerca de 750 espécies (BLOCK, 2010) das quais *Allium sativum* L. compreende ao alho cultivado. O alho é considerado a segunda principal espécie do gênero *Allium* mais amplamente consumida no mundo, com uma produção de cerca de 22 milhões de toneladas/ano (FAO, 2009).

De acordo com AGRIANUAL (2012), em 2010, o Brasil teve uma produção de aproximadamente 104 mil toneladas, em uma área de 10 mil hectares. O principal produtor de alho nacional é o estado de Goiás. Seguem, em ordem decrescente de participação, os estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

O cultivo do alho é realizado através da propagação vegetativa, ou seja, não se utiliza sementes verdadeiras ou botânicas, e sim os bulbilhos derivados dos bulbos (FAJARDO, 2000). Essa prática favorece o acúmulo de patógenos, principalmente os vírus, que são perpetuados pelos bulbilhos de um ciclo de produção a outro, assumindo um papel importante na redução da produção e qualidade do alho produzido (CARVALHO, 1986). Facilmente os vírus se disseminam pelos países através da comercialização do alho, exportações e importações, uma vez que as cultivares de alho plantadas no Brasil e em vários países do mundo estão infectadas por um ou mais vírus. No Brasil, cerca de 16.367.042 (volume - caixa) de alho vêm sendo importado, principalmente, da China e Argentina (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE ALHO, 2011).

Normalmente, a cultura do alho pode estar infectada por um complexo de vírus filamentosos pertencentes aos gêneros *Potyvirus* (Família *Potyviridae*), *Carlavirus* e *Allexivirus* (Família *Alphaflexiviridae*) (FAJARDO et al., 2001; ADAMS et al. 2011a, b, c). As espécies de potyvirus mais frequentes em alho são *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) e *Leek yellow stripe virus* (LYSV) (KLUKACKOVÁ et al., 2007). Dentre os carlavirus as mais comuns encontradas são *Garlic common latent virus* (GarCLV) e *Shallot latent virus* (SLV) (MITUTI, 2009). Já para os allexivirus oito são as espécies pertencentes ao gênero e que infectam a cultura do alho sendo elas GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E, GarV-X, GarMbFV e ShVX (ADAMS et al., 2011). Contudo, apenas cinco estão presentes no Brasil (GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D e GarMbFV) (NASCIMENTO et al., 2008).

Os vírus de alho podem ser transmitidos pela propagação vegetativa (CAFRUNE et al., 2006), bem como por vetores, como é o caso dos allexivirus que são transmitidos por ácaros da espécie *A. tulipae*; e os potyvirus e carlavirus podem ser transmitidos por afídeos (ADAMS et al., 2011a, b, c).

No Brasil, apesar de muitas espécies pertencentes ao gênero *Allexivirus* já terem sido relatadas, não há dados moleculares de isolados brasileiro disponíveis nos bancos de dados. Portanto, os objetivos do trabalho foram: otimizar técnicas de detecção para as diferentes espécies de allexivirus em alho; verificar a incidência das diferentes espécies; sequenciar a região codificadora para a proteína capsidial para análise da variabilidade nesta porção do genoma e avaliar a sanidade vegetal do alho produzido por cultura de meristema e termoterapia na FCA/UNESP-Botucatu.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Aspectos gerais da cultura do alho

O alho (*A. sativum* L.) é uma das mais antigas espécies cultivadas originária de zonas temperadas da Ásia. Acredita-se que o alho tenha origem na Ásia Central (Caucasus) e então foi disseminado em duas direções, para a China e Índia e para Europa e Rússia. O alho europeu foi então transportado para América do Sul e América do Norte (ETOH, 2002) de forma que o alho brasileiro provavelmente é descendente do alho europeu.

O alho é uma monocotiledônea, pertencente à família Alliaceae (BREWSTER, 2008; SOUZA et al, 2009; BLOCK, 2010), apresenta cerca de 50 cm ou mais de altura dependendo da cultivar. Suas folhas, estreitas e alongadas, possuem limbo, uma camada de cera que as protege do ataque de muitas doenças. As bainhas das folhas formam o pseudocaulo pequeno e achatado. Os bulbilhos apresentam morfologia ovoide arqueada, falciforme. Em condições climáticas favoráveis, as gemas do caule desenvolvem-se formando cada uma um bulbilho. A quantidade de bulbilhos que formam o bulbo é uma importante característica diferencial das cultivares. As temperaturas baixas são ideais para que a bulbificação ocorra (SOUZA et al., 2009).

As regiões Sul e Sudeste do país são as mais propícias para o cultivo do alho. A faixa de temperatura média mensal mais indicada para o bom desenvolvimento da planta varia entre 13 °C e 24 °C. É necessário que a temperatura no inverno caia abaixo de 15 °C para estimular a formação do bulbo. Temperaturas muito altas

não favorecem a formação de bulbo com bom aspecto comercial (SOBRINHO et al., 1993). Apesar de tudo, no cerrado brasileiro a cultura do alho encontra-se em expansão graças à vernalização. A técnica de vernalização, que consiste em armazenar o alho-semente em câmara com temperatura de 3 a 5 °C, por um período de 40 a 60 dias possibilitou o plantio de cultivares nobres de alho originárias da Argentina e do Sul do país em regiões onde as condições termo-fotoperiódicas não satisfazem às exigências da planta (SOUZA et al., 2009).

## 4.2 Produção

Segundo a Food Agriculture Organization- FAO (2009) o maior produtor mundial de alho é a China com mais de 17 milhões de toneladas de produção (80%), seguido da Índia com cerca de 1 milhão de toneladas. Na América do Sul, a Argentina é o maior produtor, seguido pelo Brasil, Peru e Chile. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE, de 2004 a 2010, o Brasil registrou um aumento significativo na produção, passando de 85.597 para 104.586 toneladas, o que representa um aumento da ordem de 18,15% . O maior estado brasileiro produtor de alho é Goiás com 39,72% da produção, seguido pelos estados de Minas Gerais com 16,62%, Rio Grande do Sul com 16,19% e Santa Catarina com 15,13%. Em relação às importações, o Brasil em 2010 importou 97.190 e 54.083 toneladas da China e Argentina, respectivamente (AGRIANUAL, 2012).

Devida às importações provenientes da China que se iniciaram nos anos 90, o setor alheiro viu-se frente a um grave problema: a prática do dumping. O alho desembarcado em portos brasileiros era vendido muito abaixo do praticado em solo nacional e, portanto, a concorrência era no mínimo desleal. Atualmente, o preço médio do alho brasileiro vem sendo comercializado por cerca US\$ 15,00 por caixa, enquanto o chinês US\$ 3,00 por caixa. Com tudo em 2007 com a vigência da Resolução 52/07 da CAMEX, o alho chinês importado passou a custar US\$ 5,20 (caixa de 10 quilos). Se essa resolução não impusesse essa taxa, provavelmente seria o fim da produção de alho brasileiro. Em novembro deste ano a renovação por doze meses do direito *antidumping* sobre o alho chinês foi publicada, devido a pedidos encaminhados pela Associação Nacional dos Produtores de Alho (ANAPA, 2012).

### 4.3 Vírus em alho

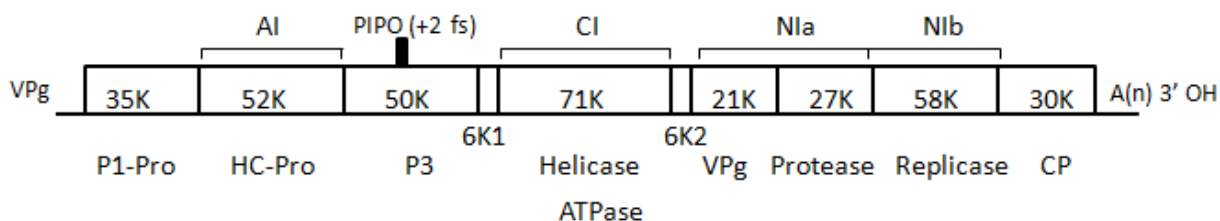
O alho encontra-se, normalmente, infectado por um complexo de vírus filamentosos pertencentes aos gêneros *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus* (FAJARDO et al., 2001).

#### 4.3.1 Gênero *Potyvirus*

O gênero *Potyvirus* pertence à família *Potyviridae*, que é dividida em seis gêneros (*Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Maclunavirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Brambyvirus* e *Bymovirus*). Sua classificação baseia-se no inseto vetor e número de componentes do genoma (ADAMS et al., 2011c). As espécies de potyvirus mais frequentes em alho são OYDV e LYSV (KLUKACKOVÁ et al., 2007). Porém há outra espécie presente em infecções na cultura do alho, *Shallot yellow stripe virus* (SYSV) (CHEN et al., 2001), aparentemente, ainda não relatado no Brasil.

O vírus é composto por uma molécula simples de RNA, senso positiva, com cerca de 9.7 kb de tamanho, suas partículas virais são filamentosas flexuosas com 680-900 nm de comprimento e 11-13 nm de espessura. A organização genômica do gênero baseia-se em uma única ORF (Open Reading Frame) responsável por codificar uma poliproteína de aproximadamente 345 kDa. Os vírus do gênero apresentam em suas extremidades duas regiões não traduzidas (NTR), ligada covalentemente a VPg (Viral protein genome-linked) na extremidade 5' e na porção 3' ligada a uma sequência de adenina (cauda Poly A) (ADAMS et al., 2011c). Recentemente uma pequena ORF incorporada na região codificadora para a proteína P3 foi identificada e denominada de Pretty Interesting Potyviridae ORF - PIPO (CHUNG et al., 2008).

A proteína codificada pela única ORF sofre autoproteólise dando origem a cada uma das proteínas virais, dentre elas estão dez proteínas: P1, HC-Pro, P3, 6KI, CI, 6K2, VPg, NIa, Nib e CP (ADAMS et al., 2011c). Uma importante característica dos potyvirus é que a maioria das proteínas codificadas é multifuncional e são produzidas em quantidades estequiometricamente idênticas (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001). Como, por exemplo, a HC-Pro, considerada uma proteína multifuncional, responsável: pela clivagem da poliproteína, auxiliar na transmissão por afídeos, movimento célula a célula e na replicação do RNA (MAIA et al., 1996).



**Figura 1.** Organização genômica da espécie *Tobacco etch virus* do gênero *Potyvirus*. (Adaptado ADAMS et al., 2011c).

### Gama de hospedeiros

A gama de hospedeiros para o gênero *Potyvirus* é muito ampla. No entanto, determinadas espécies possuem círculo restrito, como no caso do OYDV que infecta basicamente, cebola (*Allium cepa*) e alho, causando na primeira sintomas de enrolamento das folhas e nanismo, na segunda principalmente estrias amarelas e cloróticas (VAN DIJK et al., 1993 b). O OYDV foi relatado pela primeira vez em cebola nos Estados unidos (MELHUS et al., 1929).

O LYSV além de infectar alho ocasionando leves estrias até listras amarelas fortes e redução do tamanho do bulbo, também possui como hospedeiro o alho-poró (*Allium porrum*). Alguns isolados causam lesões locais necróticas em *Chenopodium album*, *Chenopodium murale*, *Chenopodium amaranticolor*, e *Chenopodium quinoa* (KATIS et al., 2012).

O LYSV foi relatado pela primeira vez em alho em 1987 (WALKEY et al., 1987), no entanto sabe-se que este vírus, antes denominado *Garlic yellow streak virus*, já havia sido previamente encontrado na Nova Zelândia como parte de um complexo viral em alho (MOHAMED e YOUNG, 1981). OYDV e LYSV são considerados os vírus mundialmente mais importantes devido à ampla distribuição (BARG et al., 1997; CHEN et al., 2001; CONCI et al., 1992; VAN DIJK, 1993b) e pela perda de produção por eles ocasionadas.

### 4.3.2 Gênero *Carlavirus*

Os vírus pertencentes ao gênero *Carlavirus*, família *Betaflexiviridae*, apresentam partículas virais flexuosas e alongadas. Medem cerca de 610 a 700 nm de comprimento e 12 a 13 nm de diâmetro. Possuem molécula de RNA linear fita simples senso positiva de 8,3 a 8,6 kb de extensão. Possuem seis ORFs, incluindo o TGB (triple gene block) e são transmitidos por pulgões. A ORF1 codifica proteínas responsáveis pela replicase; a ORF2, 3 e 4 formam o Triple Gene Block (TGB), conjunto de proteínas envolvidas no movimento célula a célula (CHEN et al., 2004). A ORF5 codifica proteínas da capa proteica e a ORF6 codifica uma proteína com função ainda desconhecida, talvez responsável pela facilidade na transmissão por afídeos, envolvida na replicação do RNA, ou ainda responsável pelo silenciamento gênico (ADAMS et al., 2011b). As espécies de carlavirus mais comuns em alho são GarCLV e SLV (MITUTI, 2009).



**Figura 2.** Organização genômica da espécie *Carnation latent virus* do gênero *Carlavirus* (Fonte: ViralZone, 2011).

#### Gama de hospedeiros

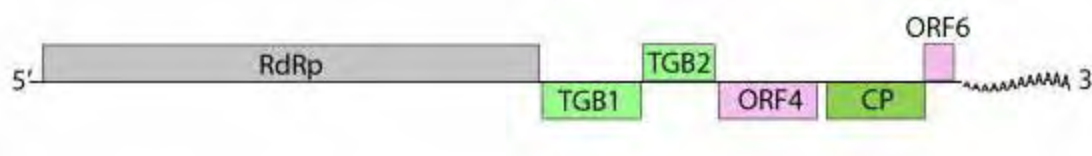
A gama de hospedeiro natural dos carlavirus é bastante restrita. O primeiro relato de um carlavirus foi o SLV, isolado de *A. cepa* var. *ascalonicum* na Holanda (BOS et al., 1978). Em condições naturais, SLV possui gama de hospedeiro restrita a família *Alliaceae*, incluindo o gênero *Allium*, bem como cebola, chalota, alho e alho-poró (VAN DIJK, 1993a). O GarCLV foi relatado inicialmente na França (DELECOLLE e LOT, 1981, apud VAN DIJK, 1993), e sua gama de hospedeiro é restrita ao gênero *Allium*, podendo infectar mais de cinquenta espécies do gênero, incluindo alho-poro, cebola e principalmente o alho (VAN DIJK, 1993a).

Carlavirus provenientes de alho podem ser transmitidos por extrato vegetal para as espécies *Celosia argentea* var. *plumosa*, *C. amaranticolor*, *C. quinoa* e *Nicotiana occidentalis* (VAN DIJK, 1993a).

### 4.3.3 Gênero *Allexivirus*

O gênero *Allexivirus* pertence à família *Alphaflexiviridae* e seus membros são transmitidos por ácaros. As partículas virais são filamentosas flexuosas e medem 800 nm de comprimento e 12 nm de diâmetro. Possuem uma molécula de RNA linear de fita simples senso positiva com 9.0 kb de tamanho, incluindo a cauda poly (A) na extremidade 3' e a CAP no terminal 5'. A organização genômica baseia-se em seis ORFs. A ORF1 codifica a proteína 195 kDa, responsável pela polimerase viral; a ORF2 e 3 codificam as proteínas 26 kDa e 11 kDa, respectivamente, similares as duas primeiras proteínas codificadas pelo TGB; a ORF4 codifica uma proteína de 42 kDa que não apresenta homologia com nenhuma proteína conhecida, mas parece estar envolvida com a montagem da partícula viral; ORF5 correspondente a capa proteica e a ORF6 codifica a proteína “dedo de zinco”, com função ainda desconhecida (ADAMS et al., 2011a).

Oito são as espécies pertencentes ao gênero e que infectam a cultura do alho: GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E, GarV-X, GarMbFV e ShVX (ADAMS et al., 2011a). Contudo, apenas cinco foram descritas no Brasil até o momento (GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D e GarMbFV) (NASCIMENTO et al., 2008).



**Figura 3.** Organização genômica da espécie tipo do gênero *Allexivirus*, *Shallot virus X* (Fonte: ViralZone, 2011).

#### Gama de hospedeiros

Os allexivirus possuem gama de hospedeiras bastante restritas, como por exemplo: chalota, cebola, alho e alho poro. Alguns isolados são experimentalmente transmitidos para *C. murale*, no qual induzem lesão local (ADAMS et al., 2011a).



#### 4.4 Sintomatologia

Os sintomas de mosaico em alho são frequentemente associados com infecções de vários vírus, que incluem três potyvirus (LYSV, OYDV e SYSV), e vários membros do gênero *Carlavirus* e *Allexivirus* (CHEN et al., 2001, TSUNEYOSHI et al., 1998). Estes vírus causam degeneração da planta, amarelecimento, redução do crescimento e da produção (PAVAN, 1998; CARVALHO, 1986).

Os vírus interferem diretamente nos fenômenos vitais para o desenvolvimento da planta, ou seja, na síntese de proteínas e na fotossíntese, ocasionando reduções significativas na concentração de clorofila, vigor vegetativo e prejudicando a formação dos bulbos, devido a redução na produção de carboidratos (ZAMBOLIM et al., 2007).

Sintomas típicos de infecção viral por allexivirus em alho incluem o subdesenvolvimento da planta, estrias cloróticas, padrões de mosaico e folhas retorcidas (KANG et al. 2007).

Tradicionalmente, a maior perda econômica no rendimento da cultura do alho é atribuída à presença de potyvirus, no qual OYDV e LYSV reduzem cerca de 69% e 54% do peso dos bulbos, respectivamente (LUNELLO et al., 2007). Contudo, a perda na produção é maior quando a planta de alho encontra-se infectada por um complexo viral. Dentre os GarV-A e GarV-C, o primeiro reduz cerca de 14-32% o peso dos bulbos, comparado com 15% para GarV-C na cultivar Blanco Iffive e Morado Inta (CAFRUNE et al., 2006).

Para carlavirus, os vírus apresentam-se aparentemente assintomáticos em chalota, cebola e alho, mas agem sinergisticamente com os potyvirus. Em plantas de alho poro infectadas isoladamente com carlavirus podem aparecer desde suaves estrias cloróticas a clorose severa ou estrias brancas e até a morte da planta reinfectada com LYSV (PALUDAN, 1980).

#### 4.5 Transmissão

A propagação vegetativa do alho é o principal mecanismo através do qual os vírus são levados e perpetuados para outras regiões. Além da propagação

vegetativa, os vírus podem ser transmitidos por afídeos como os potyvirus e carlavirus, e ácaros no caso dos allexivirus (ADAMS et al., 2011a, b, c).

Os pulgões, denominados afídeos, apresentam aparelho bucal do tipo sugador e transmitem cerca de 275 espécies de vírus, sendo considerados os mais importantes insetos vetores. Os carlavirus e potyvirus possuem relação vírus-vetor do tipo não persistente (VAN DIJK, 1993a),

A cultura do alho é visitada, constantemente, por diversas espécies de afídeos: *Lipaphis* sp. (Mordvilko), *Rhopalosiphum* sp. (Koch), *Aphis* sp. (L.), *Geopemphigus* sp. (Hille), *Myzus* sp. (Passerini), *Hyperomyzus* sp. (Börner) e *Neotoxoptera* sp. (Theobald) (MELO FILHO et al., 2004; MELO FILHO et al., 2002), entretanto, somente o *Neotoxoptera formosana* e *Myzus ascalonicus* colonizam as plantas de alho (BLACKMAN e EASTOP, 2000). O OYDV é transmitido por várias espécies de pulgões, incluindo *Myzus persicae*, *Aphis gossypii* e *Macrosiphum ambrosiae* (MASSOLA et al., 2005).

Estudos realizados por Kang et al. (2007) demonstraram que ácaros da espécie, *Aceria tulipae* (família *Eriophyidae*), o “acarado do bulbo seco” transmitem os allexivirus.

#### **4.6. Diagnose dos vírus em alho**

A utilização de plantas indicadoras é um método bastante empregado para estudo de vírus em plantas. Contudo a transmissão dos vírus em alho por extrato vegetal tamponado é um método de diagnose pouco eficiente, pois os vírus de alho são geralmente restritos às aliáceas (PAVAN, 1998). Existem algumas plantas utilizadas na identificação de vírus de alho e que podem exibir reação de hipersensibilidade, lesões locais cloróticas ou necróticas ou ainda necrose sistêmica, como é o caso de *N. occidentalis* inoculada com GarCLV (VAN DIJK, 1993a). Algumas plantas indicadoras para os principais vírus de alho são: *C. quinoa*, *C. murale*, *C. amaranticolor*, *N. occidentalis* e *C. argentea* var. *plumosa* (VERBEEK et al., 1995). Para os allexivirus a transmissão pode ser realizada para *C. murale* que exibe lesão local (ADAMS et al., 2011a).

A imersão foliar rápida “leaf dip”, descrita por Kitajima (1965) possibilita a visualização de partículas virais diretamente dos tecidos infectados ao microscópio eletrônico de transmissão. Apesar de ser uma técnica rápida seu custo é

elevado e necessita de mão de obra especializada além de possibilitar a identificação a nível de gênero ou família, e não a nível de espécie. Para diagnose por espécie, a microscopia eletrônica pode ser utilizada em conjunto com técnicas sorológicas, técnica de microscopia eletrônica de Imunoabsorção (ISEM), descrita por Vega e Kuniyuki (1986) e Koenig (1988).

Testes sorológicos são empregados eficientemente para a diagnose de vírus de alho. Antissoros comerciais estão disponíveis para determinadas espécies ou gêneros de vírus de alho, como é o caso das duas espécies de carlavirus (GarCLV e SLV) e no caso do antissoro universal para potyvirus e para as espécies, OYDV e LYSV, comercializado pela empresa Agdia.

Para os allexivirus um antissoro monoclonal específico para GarV-A, GarV-B e GarV-C e um antissoro policlonal capaz de detectar as três espécies de allexivirus e GarV-D foi utilizado por YAMASHITA et al., (1996), e um antissoro policlonal contra GarV-A obtido no Iffive/Inta, Argentina, foi utilizado por Melo Filho et al.(2004).

Com o avanço da biologia molecular foi possível desenvolver métodos de diagnose de alta sensibilidade na detecção de vírus. Para os vírus de alho já estão disponíveis em literatura oligonucleotídeos para identificação dos gêneros *Allexivirus*, *Carlavirus* e *Potyvirus*.

Além da técnica de PCR tradicional, o PCR quantitativo é altamente específico e para o OYDV e LYSV mostrou-se 60% a 70% mais eficiente quando comparados com o teste de ELISA utilizado para os mesmos vírus (LUNELLO et al., 2004).

#### **4.7 Controle**

Em relação ao controle das doenças ocasionadas pelos vírus, diferentes metodologias são aplicadas, dentre elas a associação de termoterapia e cultura de tecido, indexação para os principais vírus e obtenção de alho-semente livre de vírus com alta qualidade fitossanitária para posterior propagação (PAVAN, 1998).

Na cultura do alho não se faz controle de afídeos que transmitem os vírus, pois os pulgões não são considerados pragas da cultura (NAKANO et al., 2002; SOUZA et al., 2009). Além disto, a relação vírus-vetor é do tipo não persistente, e o

pulgão pode transmitir o vírus em poucos segundos (SATURNINO e CRUZ FILHO, 1980; ZAMBOLIM et al., 2007). Para o gênero *Allexivirus*, o ácaro vetor é controlado através do tratamento por imersão dos bulbilhos em acaricidas antes do plantio (NAKANO et al., 2002; MENEZES SOBRINHO, 1997). Portanto não há medidas efetivas de controle de doenças causadas por vírus em alho, e sim medidas preventivas e gerais de manejo da cultura (FAJARDO et al, 2000).

Uma alternativa, viável e com baixo custo, sugerida por Pavan (1998) é a utilização de clones assintomáticos selecionados no campo de produção, que proporcionam maior capacidade de aclimatização, maior produtividade e melhor qualidade dos bulbos.

A associação de práticas culturais também favorece o bom desenvolvimento das plantas e visam reduzir a disseminação de vírus no campo, tais como: evitar plantios sucessivos, evitar culturas novas próximas às mais velhas, controlar as plantas daninhas hospedeiras de afídeos próximas à cultura e eliminar restos de cultura contaminados (MASSOLA et al., 2005).

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Coleta de amostras de alho**

Foram realizadas coletas em regiões produtoras de alho, como São Manuel, SP; Botucatu, SP; Guarapuava, PR; Santa Juliana, MG; Cristalina, GO e Campo Alegre, GO (Tabela 1). Plantas preferencialmente com sintomas de ataque de ácaro (Figura 1) foram coletadas. As folhas foram preservadas em ultra-freezer até o momento da análise.

**Tabela 1.** Período, número de amostras e localidade das plantas sintomáticas coletadas durante julho de 2010 a agosto de 2012.

Coletas	Período de Coletas	Nº de amostras coletadas	Localidade
1	Julho 2010	24	Botucatu-SP
2	Setembro 2010	14	Guarapuava-PR
3	Outubro 2010	23	Guarapuava-PR
4	Maio 2011	18	Santa Juliana-MG
5	Julho 2011	28	Santa Juliana-MG
6	Agosto 2011	32	São Manuel- SP
7	Setembro 2011	20	Guarapuava-PR
8	Outubro 2011	62	Guarapuava-PR
9	Maio 2012	60	Santa Juliana-MG
10	Maio 2012	4	Cristalina-GO
11	Julho 2012	14	Santa Juliana-MG
12	Julho 2012	21	Campo Alegre-GO
13	Agosto 2012	4	Campo Alegre-GO
14	Agosto 2012	10	Botucatu-SP
15	Agosto 2012	14	Guarapuava
Total		<b>348</b>	



**Figura 4.** Plantas de alho com sintomas típicos de ataque de ácaro e infectadas por allexivirus.



**Figura 5.** Folhas de alho apresentando infestação pelo ácaro *Aceria tulipae*.

## 5.2. Extração de RNA total

Foram avaliadas duas metodologias de extração de RNA total. Pelo método de Bertheau (1998) folhas de plantas foram trituradas (1:5 p/v) em tampão PBS-Tween contendo PVP K25 a 2 % (p/v) e Na-DIECA 20 mM, e centrifugadas em tubos de microcentrífuga por 10 minutos a 13.000 rpm (Centrifuga Eppendorf 5804 R). Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, acrescentando-se SDS a 1 %. Após incubação a 55°C por 15 minutos, foram adicionados 100 µl de solução de acetato de potássio a 3M e seguindo por agitação da solução. Posteriormente as amostras foram incubadas em gelo por 5 minutos e centrifugadas por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 700 µl de NaI 6 M e 5 µl de uma solução contendo silício. A solução foi bem agitada e mantida por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi centrifugada por um minuto a 5.000 rpm, o sobrenadante descartado e o 'pellet' lavado duas vezes com 500 µl de Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM e igual volume de etanol absoluto. Após centrifugação por 1 minuto a 5.000 rpm, o 'pellet' foi secado a vácuo e o RNA ressuspendido em 400 µl de água Milli-Q tratada com DEPC, seguido de incubação por 5 minutos a 55°C e centrifugação por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante (300 µl) foi

transferido para um novo tubo e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Uma alíquota de  $2,5\ \mu\text{l}$  foi utilizada para a RT-PCR.

O Kit de extração Total RNA Purification da marca Norgen também foi testado seguindo-se as instruções descritas pelo fabricante.

### **5.3. Transcrição reversa e Reação de Polimerização em Cadeia (RT-PCR)**

Testes via RT-PCR foram realizados utilizando oligonucleotídeos específicos para as espécies GarV-A, GarV-C e GarV-D (MELO FILHO et al.; 2004). Para a espécie GarMbFV o oligonucleotídeo usado foi o descrito por Fayad-André et al. (2011). Os demais testes foram realizados com oligonucleotídeos desenhados neste trabalho.

#### **5.3.1. Obtenção de oligonucleotídeo universal para *Allexivirus***

Oligonucleotídeos universais para o gênero foram sintetizados com objetivo de detectar as diferentes espécies de allexivirus. Os oligonucleotídeos universais foram desenhados baseando-se em um alinhamento múltiplo entre sequências de diferentes espécies de allexivirus disponíveis no Banco de Dados de DNA GenBank., utilizando o programa Mega 4.0 (KUMAR et al., 2008) (Apêndice 1).

A amplificação parcial da região codificadora da proteína capsidial (CP) dos allexivirus foi realizada com os oligonucleotídeos universais (Tabela 2) e a condição de RT-PCR foi otimizada em uma só etapa, utilizando-se o Kit PCR Master Mix (Promega). Para um volume de  $25\ \mu\text{l}$  adicionou-se  $12,5\ \mu\text{L}$  de PCR Master Mix 2X,  $100\ \mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo, 1 unidade da transcriptase reversa AMV (Avian myeloblastosis virus, marca Promega a  $15\ \text{unidades}/\mu\text{L}$ ),  $2,5\ \mu\text{L}$  de RNA e água livre de RNAses para completar o volume de  $25\ \mu\text{L}$ . O ciclo utilizado consistiu em 30 minutos a  $42^{\circ}\text{C}$ , seguido de 40 segundos à  $94^{\circ}\text{C}$ , 40 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}/40\ \text{segundos}$ ,  $50^{\circ}\text{C}/50\ \text{segundos}$  e  $72^{\circ}\text{C}/40\ \text{segundos}$ , e finalizando com  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.



**Tabela 2.** Sequências dos oligonucleotídeos universais para amplificação parcial da região codificadora da proteína capsidial de diferentes espécies pertencentes ao gênero *Allexivirus* em alho. CPallexi-senso2/CPallexi-anti1 amplificam um fragmento em torno de 237 bp.

Oligonucleotídeo	Sequência
Cpallexi-senso2	5' CTACCACAAYGGNTCVTC 3'
Cpallexi-anti1	5' CACNGCGTTRAAGAARTC 3'

### 5.3.2. Utilização de oligonucleotídeos descritos em literatura

Posteriormente foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para as espécies GarV-A, GarV-C e GarV-D (MELO FILHO et al., 2004) e GarMbFV (FAYAD-ANDRÉ et al., 2011) descritos na Tabela 3. Estes oligonucleotídeos amplificam a região codificadora para a proteína capsidial completa das respectivas espécies de allexivirus.

**Tabela 3.** Sequências dos oligonucleotídeos para amplificação completa da região codificadora da proteína capsidial das espécies GarV-A, GarV-C, GarV-D (MELO FILHO et al., 2004) e GarMbFV (FAYAD-ANDRÉ et al., 2011).

Oligonucleotídeo	Sequência
GarV-A1	5' CCCAAGCTTACTGGAAGGGTGAATTAGAT 3'
GarV-A2	5' CCCAAGCTTAGGATATTAAGTCTTGAGG 3'
GarV-C1	5' CCCAAGCTTCATCTACAACAACAAAGGCG 3'
GarV-C2	5' CCCAAGCTTATAAGGGTGCATGATTGTGG 3'
GarV-D1	5' CCAAGCTTAAGCAAGTGAAGAGTGTAAG 3'
GarV-D2	5' CCAAGCTTTTTGGAAGAGGAGGTTGAGA 3'
GarMbFV senso	5' CCATGGACGACCCTGTTGACCCAA 3'
GarMbFV antisenso	5' CCATGGAGAACGTAATCATGGGAGG 3'

### 5.3.3. Obtenção de oligonucleotídeos específicos para *Garlic virus B*.

Para GarV-B, os oligonucleotídeos descritos por Melo Filho et al., 2004 não se mostraram específicos para esta espécie de modo que foram obtidos novos oligonucleotídeos utilizando como referência sequências disponíveis no Banco de Dados de DNA GenBank utilizando o programa Mega 4.0 (KUMAR et al., 2008) (Apêndice 2 e 3). Os oligonucleotídeos utilizados foram: CPBS2/CPBA1 para CP parcial e GarV-BS1/GarV-BA2 para CP completa (Tabela 4).

**Tabela 4.** Sequências dos oligonucleotídeos obtidos para amplificação parcial e região completa codificadora para a proteína capsidial da espécie GarV-B. CPBS2/CPBA1 e GarV-BS1/GarV-BA2 amplificam um fragmento em torno de 430 bp e 980 bp respectivamente.

<b>Oligonucleotídeo</b>	<b>Sequência</b>
<b>CPBS2</b>	5' GCAGAATAARCCCCCYTC 3'
<b>CPBA1</b>	5' RAAGGGTTTATTCTGTTG 3'
<b>GarV-BS1</b>	5' CTYYTACACTCCAAATGTCCC 3'
<b>GarV-BA2</b>	5' GTRAAGGGTTTATTCTGTTGG 3'

Os oligonucleotídeos CPBS2/CPBA1 para CP parcial e GarV-BS1/GarV-BA2 para CP completa foram testados em RT-PCR em uma só etapa, utilizando-se o Kit PCR Master Mix (Promega). Para um volume de 25 µl adicionou-se 12,5 µL de PCR Master Mix 2X, 100 µM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade da transcriptase reversa AMV (Avian myeloblastosis virus, marca Promega), 2,5 µL de RNA e água livre de RNases para completar o volume de 25 µL. O ciclo utilizado para ambos os testes (CP parcial e CP completa) consistiu em 30 minutos a 42 °C, seguido de 2 minutos à 95 °C, 39 ciclos de 94 °C/30 segundos, 50 °C/60 segundos e 72 °C/60 segundos, e finalizando com 72 °C por 10 minutos.

#### **5.3.4. Obtenção de oligonucleotídeos para espécies exóticas de allexivirus**

Oligonucleotídeos específicos para GarV-E, GarV-X e ShVX foram obtidos para amplificação parcial da região codificadora da proteína capsidial destes vírus (Tabela 5). A obtenção desses oligonucleotídeos foi através de um alinhamento múltiplo entre sequências das diferentes espécies disponíveis no Banco de Dados de DNA GenBank., utilizando o programa Mega 4.0 (KUMAR et al., 2008) (Apêndice 4 - alinhamento para GarV-X).

**Tabela 5.** Sequências dos oligonucleotídeos obtidos para amplificação parcial da região codificadora da proteína capsidial de espécies exóticas de allexivirus no Brasil.

<b>Espécies exóticas testadas</b>	<b>Oligonucleotídeos</b>	<b>Sequências</b>
<b>GarV-E senso 1</b>	CPES1	5' GGRTCGTCACGATTYGTTAC 3'
<b>GarV-E senso 2</b>	CPES2	5' GCCYCACKCAGAGCTTAAAG 3'
<b>GarV-E anti-senso 1</b>	CPEA1	5' YTTGAACCTCATACCYCC 3'
<b>GarV-E anti-senso 2</b>	CPEA2	5' CTTAGCGTTCATGGAGTG 3'
<b>GarV-X senso 1</b>	CPXS1	5' RCAAGCAATCARARTCAAC 3'
<b>GarV-X senso 2</b>	CPXS2	5' GCCTTCTGAAAATGACTTAG 3'
<b>GarV-X anti-senso 1</b>	CPXA1	5' CTAGGATTTGCTGTTGGG 3'
<b>GarV-X anti-senso 1</b>	CPXA2	5' CTTYGCR TTCATGGAGTG 3'
<b>ShVX senso 1</b>	CPSHs1	5' GAATGCATCAGGRGAYCTC 3'
<b>ShVX senso 2</b>	CPSHs2	5' CCCACAGAAGCTGAAMTC 3'
<b>ShVX anti-senso 1</b>	CPSHA1	5' GCRGGRGGTTTCTTCTG 3'
<b>ShVX anti-senso 2</b>	CPSHA2	5' RTTGAAGAAATCGAAGCCGG 3'

Os oligonucleotídeos foram testados em RT-PCR em uma só etapa, utilizando-se o Kit PCR Master Mix (Promega). Para um volume de 25 µl adicionou-se 12,5 µL de PCR Master Mix 2X, 100 µM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade da transcriptase reversa AMV (Avian myeloblastosis virus, marca Promega a 15 unidades/µL), 2,5 µL de RNA e água livre de RNases para completar o volume de 25 µL.

#### **5.4. Clonagem dos fragmentos em vetor pGEM-T Easy.**

Os fragmentos amplificados com baixa concentração de cDNA foram clonados em vetor pGEMT-Easy (Promega) utilizando-se células competentes de *Escherichia coli* da estirpe XL1 preparadas para eletroporação. Colônias brancas foram selecionadas para análise por miniprep seguido de clivagem enzimática com a Enzima *EcoRI* e posterior sequenciamento genético. As sequências foram analisadas pelos programas Blast n (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e MEGA 4.0 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) para verificação da identidade viral, e a variabilidade entre os isolados coletados.

### 5.5 Análise da sanidade vegetal do alho livre de vírus produzidos na FCA

Os testes foram realizados por RT-PCR com os oligonucleotídeos universais para allexivirus (Cpallexi-senso2/Cpallexi-anti1) conforme descrito no item 5.3.1 e para carlavírus e potyvirus descritos na Tabela 6.

Para carlavirus e potyvirus as reações de RT-PCR foram realizadas em uma só etapa, utilizando-se o Kit PCR Master Mix (Promega). Para um volume de 25 µl adicionou-se 12,5 µL de PCR Master Mix 2X, 100 µM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade da transcriptase reversa AMV (Avian myeloblastosis virus, marca Promega a 15 unidades/µL), 2,5 µL de RNA e água livre de RNases para completar o volume de 25 µL. O ciclo utilizado para carlavirus consistiu em 30 minutos a 42 °C, seguido de 2 minutos à 94 °C, 40 ciclos de 94 °C/60 segundos, 50 °C/60 segundos e 72 °C/60 segundos, e finalizando com 72 °C por 10 minutos. Para potyvirus o ciclo usado consistiu de 3 minutos a 42 °C, seguido de 3 minutos a 95 °C, 94 °C/2 minutos, 94 °C/3 segundos, 60 °C/45 segundos, 72°C/ 55 segundos, 94 °C/30 segundos, 57°C/45 segundos, 72 °C/55 segundos, 94 °C/30 segundos, 54°C/45 segundos e 72 °C/55 segundos, 35 ciclos de 94 °C/30 segundos, 54 °C/45 segundos e 72 °C/55 segundos, finalizando com 68 °C por 7 minutos.

**Tabela 6.** Oligonucleotídeos utilizados para detecção de vírus pertencentes aos gêneros *Carlavirus* e *Potyvirus*. WCIEN/PV1 foram descritos por Mota (2004) e SLV/GCLV 7303 e SLV/GCLV 7665 por Mituti (2009).

Gênero	Oligonucleotídeo	Sequência
<i>Carlavirus</i>	SLV / GCLV 7303	5' GGNTKKGAAWCTGGGAGDCC 3'
	SLV / GCLV 7665	5' CATKTMATTCCAAACAACNGGYGC 3'
<i>Potyvirus</i>	WCIEN	5' ATGGTTTGGTGYATYGARAAT 3'
	PV1	5' GATTTAGGTGACACTATAGT 3'

### 5.6. Sequenciamento e análise

Os produtos foram enviados para o Centro de Estudos de Genoma Humano da USP em São Paulo, para Universidade Estadual Julio Mesquita Filho (Campus de Rubião) ou Macrogen (Coreia). As amostras sequenciadas foram analisadas pelo programa 'NCBIBLAST' (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e Clustal W (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) e a construção da árvore filogenética foi realizado utilizando-se programa MEGA 4.0.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Teste de eficiência dos oligonucleotídeos obtidos

#### 6.1.1 Oligonucleotídeos universais para *Allexivirus*

Diferentes combinações de oligonucleotídeos para detecção de *allexivirus* em alho foram testadas. O par de oligonucleotídeos universais, Cpallexi-senso 2 e Cpallexi-anti 1 capaz de amplificar um fragmento de 237 bp da região codificadora para a proteína capsidial foi escolhido para ser utilizado em rotina e otimizado para um teste de RT-PCR em uma só etapa e tem se mostrado eficiente e sensível na detecção das espécies (Figura 6).

As amostras positivas para os oligonucleotídeos universais foram posteriormente submetidas à análise com os oligonucleotídeos específicos para GarV-A, GarV-C e GarV-D descritos por Melo Filho et al. (2004); GarV-B e GarV-X descritos nesse trabalho; GarMbFV descrito por Fayad-André et al. (2011). Através do sequenciamento do fragmento viral, pôde-se confirmar a especificidade do teste, pois quase todas as amostras amplificadas por RT-PCR para detecção de *allexivirus* mostraram-se infectadas por uma das espécies acima testadas.

### **6.1.2. Oligonucleotídeos específicos para *Garlic virus B***

Diferentes combinações de oligonucleotídeos para detecção parcial da região codificadora da proteína capsidial para GarV-B em alho foram testadas. Dentre os testes realizados, o teste CPBS2 / CPBA1 apresentou melhor resultado. A comprovação da identidade viral foi realizada com o sequenciamento dos fragmentos amplificados. E atualmente o par de oligonucleotídeos CPBS2 / CPBA1 tem sido utilizado em rotina no laboratório amplificando um fragmento de 430 bp da região codificadora para a proteína capsidial (Figura 6).

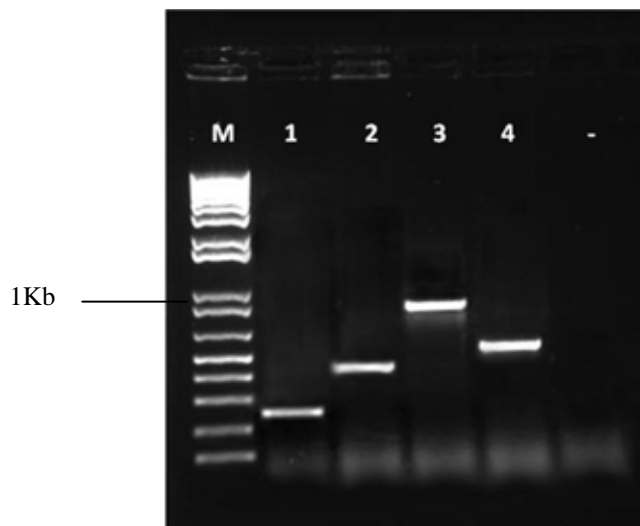
Os oligonucleotídeos desenhados para amplificação completa da região codificadora da proteína capsidial para GarV-B foram testados e dentre os testes realizados, o par de oligonucleotídeo GarV-BS1/ GarV-BA2 apresentou melhor resultado amplificando um fragmento de 980 bp da região codificadora para a proteína capsidial (Figura 6). A comprovação da identidade viral foi realizada com o sequenciamento dos fragmentos amplificados e atualmente é o teste utilizado para análise genética dos isolados de GarV-B.

### **6.1.3. Oligonucleotídeos específicos para *Garlic virus X*.**

Diferentes combinações de oligonucleotídeos para detecção de GarV-X em alho foram testadas. A melhor combinação foi a dos oligonucleotídeos CPXS2 e CPXA1. A eficácia do teste foi confirmada através do sequenciamento dos fragmentos amplificados. O tamanho do fragmento capaz de amplificar a região parcial codificadora da capa proteica de GarV-X é aproximadamente 554 bp (Figura 6).

### **6.1.4 Oligonucleotídeos específicos para GarV-E e ShVX.**

Testes para GarV-E e ShVX foram realizados, porém não foi possível detectá-los em nenhuma das amostras analisadas, porém como não dispomos de controle positivo não sabemos se o problema consiste no oligonucleotídeos desenhados ou ausência destas espécies em alho no Brasil.



**Figura 6.** Gel de agarose a 0,8% com reações de RT-PCR para allexivirus utilizando oligonucleotídeos universais e específicos para GarV-B (CP parcial e CP completa) e GarV-X. (M) Marcador 1 Kb Plus DNA ladder; (1) Amostra positiva para allexivirus (oligonucleotídeos Cpallexi-senso 2/ Cpallexi-anti 1); (2-3) Amostras positivas para GarV-B (CPBS2 / CPBA1- CP parcial) e (GarV-BS1 / GarV-BA2- CP completa); (4) Amostra positiva para GarV-X (CPXS2/ CPXA1). (-) Controle negativo. O tamanho do fragmento amplificado para as diferentes combinações foi de 237, 430, 980 e 554 nucleotídeos, respectivamente.

## 6.2. Análise das amostras coletadas

O total de 348 plantas na maioria com sintomas de ataque típico por ácaros ou com mosaico em estrias foram analisadas para a presença de allexivirus. Cento e sessenta (46%) foram positivas para GarV-A, GarV-B, GarV-C e GarV-D. Destas, 89 estavam infectadas por GarV-A, 36 por GarV-B, 57 por GarV-C e 101 por GarV-D indicando predominância das espécies GarV-A e GarV-D. Praticamente metade das amostras apresentaram infecção entre mais de uma espécie de allexivirus (Tabela 7).

Centos e noventa e cinco (56%) foram positivas com o par de oligonucleotídeos universal para allexivirus, sendo trinta e cinco negativas para GarV-A, GarV-B, GarV-C e GarV-D evidenciando possível ocorrência de outras espécies de allexivirus. Das 348 amostras analisadas, 239 foram testadas para a presença de GarMbFV verificando-se infecção por esta espécie em 24 amostras. Destas 24, uma estava infectada somente por GarMBFV e havia sido detectada pelos oligonucleotídeos universais. As

demais apresentaram infecção mista entre GarMBFV e GarV-A, GarV-B, GarV-C e GarV-D (Tabela 8).

**Tabela 7.** Número de amostras de alho com infecção simples e mista entre GarV-A, GarV-B, GarV-C e GarV-D. Os dados de GarMbFV não foram contabilizados nessa tabela, pois das 348 amostras somente 239 foram analisadas.

<u>Espécies de Alexivirus</u>	<u>Número de amostras positivas</u>
<u>Amostras positivas em infecções simples</u>	
GarV-A	21
GarV-B	2
GarV-C	3
GarV-D	55
<b>Total de Infecções simples</b>	<b>81</b>
<u>Amostras positivas em infecções mistas</u>	
GarV-A / GarV-B	2
GarV-A / GarV-C	7
GarV-A / GarV-D	22
GarV-B / GarV-C	4
GarV-C / GarV-D	6
GarV-A/GarV-B/GarV-C	20
GarV-A/GarV-C/GarV-D	10
GarV-A/GarV-B/GarV-D	1
GarV-B/GarV-C/GarV-D	1
GarV-A/GarV-B/GarV-C/GarV-D	6
<b>Total de Infecções mistas</b>	<b>79</b>
<b>Total de amostras positivas para GarV-A, GarV-B, GarV-C ou GarV-D</b>	<b>160</b>



**Tabela 8.** Número de amostras de alho com infecção simples e mista entre GarMbFV, GarV-A, GarV-B, GarV-C e GarV-D.

<u>Espécies de Allexivirus</u>	<u>Número de amostras positivas</u>
<u>Amostras positivas em infecções simples</u>	
GarMbFV	1
<u>Amostras positivas em infecções mistas</u>	
GarV-A / GarMbFV	1
GarV-A / GarV-B / GarMbFV	2
GarV-A / GarV-C / GarMbFV	3
GarV-A / GarV-D / GarMbFV	2
GarV-A / GarV-B / GarV-C / GarMbFV	9
GarV-A/GarV-C/GarV- D/GarMbFV	1
GarV-A/GarV-B/GarV-C/GarV- D/GarMbFV	3
GarV-B/GarV-C/GarMbFV	2
<b>Total de amostras positivas para GarMbFV</b>	<b>24</b>
<b>Total de plantas analisadas</b>	<b>239</b>

Dentre as espécies exóticas de allexivirus analisadas foi possível detectar o GarV-X em 30 amostras provenientes de Santa Juliana, São Manuel e Guarapuava. Todas estas amostras foram positivas para allexivirus com os oligonucleotídeos universais, porém negativas para GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D; e apenas uma amostra positiva apresentou infecção mista com GarMBFV. A notificação ao ministério da Agricultura e Pecuária Abastecimento (MAPA) foi realizada e encontra-se em análise a permissão para a publicação dos dados.

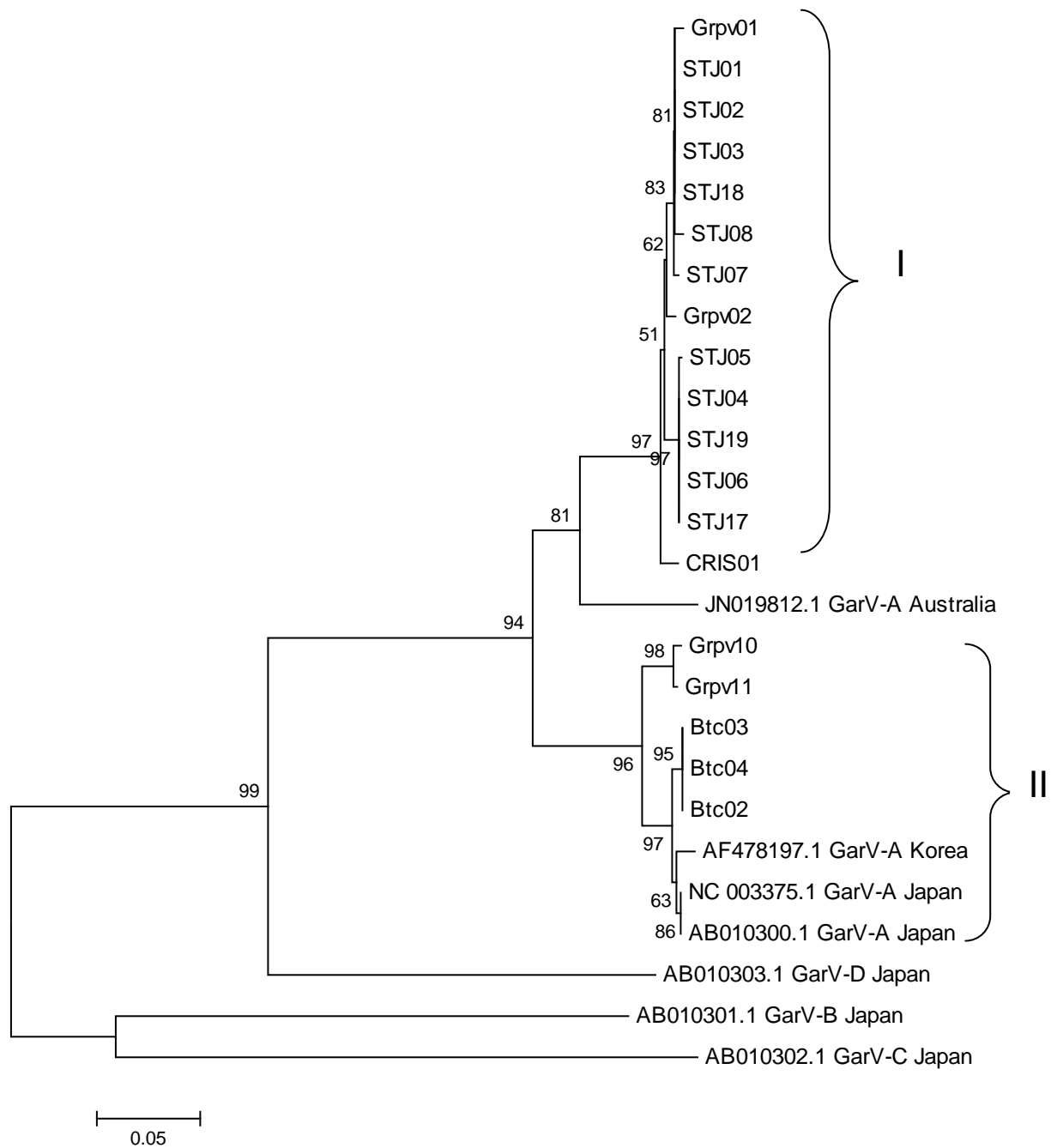
### **6.3. Análise da variabilidade genética dos isolados**

Dezenove amostras positivas para os oligonucleotídeos específicos de GarV-A foram selecionadas para sequenciamento da região codificadora para proteína capsidial. Foi possível verificar que a identidade de nucleotídeos variou entre 82.4% a 96.1% entre as sequências de GarV-A. Segundo os critérios atualmente aceitos pelo ICTV (ADAMS et al, 2011a) uma mesma espécie de allexivirus possui identidade de nucleotídeos superior a 72% para a sequência de nucleotídeos completa para a porção

codificadora da proteína capsial. Com relação a sequencia de aminoácidos, esta deve ser superior a 80% para esta mesma região do genoma. Deste modo comprovou-se que todos as amostras amplificadas para GarV-A pertencem a esta espécie viral.

Analisando-se a região codificadora para a proteína capsial dos isolados de GarV-A, foi observado que os isolados brasileiros se agrupam em dois ramos filogenéticos distintos, um englobando isolados brasileiros coletados em Santa Juliana, Guarapuava e Cristalina: Grpv01, STJ01, STJ03, STJ02, STJ08, STJ18, STJ07, Grpv02, STJ05, STJ06, STJ17, STJ04, STJ19 e Cris01 e outro ramo para os isolados brasileiros de Guarapuava e Botucatu: Grpv10, Grpv11, Btc02, Btc03, Btc04. Este segundo ramo filogenético esta mais próximos dos isolados de GarV-A encontrados na Coréia (Número de acesso AF478197.1) e Japão (NC\_003375.1 e AB010300.1) (Figura 7). Analisando-se o valor de bootstrap, estes diferentes ramos filogenéticos estão suportados por um valor de 94% indicando claramente a separação destes dois grupos de isolados de GarV-A. Esta separação não está relacionada com a região de coleta das amostras sequenciadas.

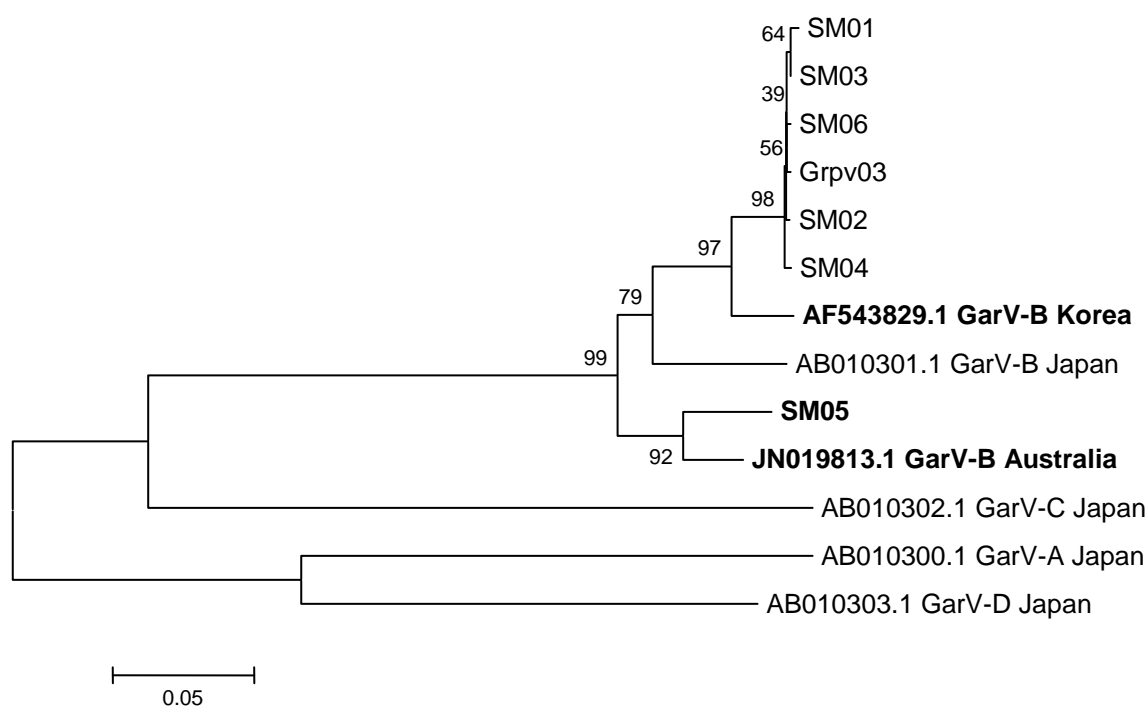
Os isolados do grupo I compartilham 95.4-97.7% de identidade de nucleotídeos entre si, enquanto que o grupo II compartilham 93.2%-97.3% de identidade. Entre os grupos I e II a identidade varia entre 83.7-84.8%. O isolado de GarV-A descrito na Austrália (JN019812.1) por Wylie et al. (2012) está mais próximo geneticamente dos isolados de GarV-A. do grupo I, com 86.7-87.5% de identidade (Tabela 9).



**Figura 7-** Árvore Filogenética da sequência completa de nucleotídeos da proteína capsial de isolados de GarV-A. A árvore foi construída pelo método neighbour-joining com o programa MEGA 4.0 Bootstrap (2,000 replicatas).



Dentre os isolados de GarV-B, um isolado coletado em São Manuel (SM05) apresentou 90% de identidade de nucleotídeos com o isolado JN019813.1 de GarV-B descrito na Austrália (WYLIE et al., 2012) enquanto que os outros isolados de São Manuel e Guarapuava estão filogeneticamente relacionados ao isolado AF543829.1 da Coreia (Figura 8). A identidade de nucleotídeos da CP variou de 83%-90.4% entre as sequencias analisadas (Tabela 10).

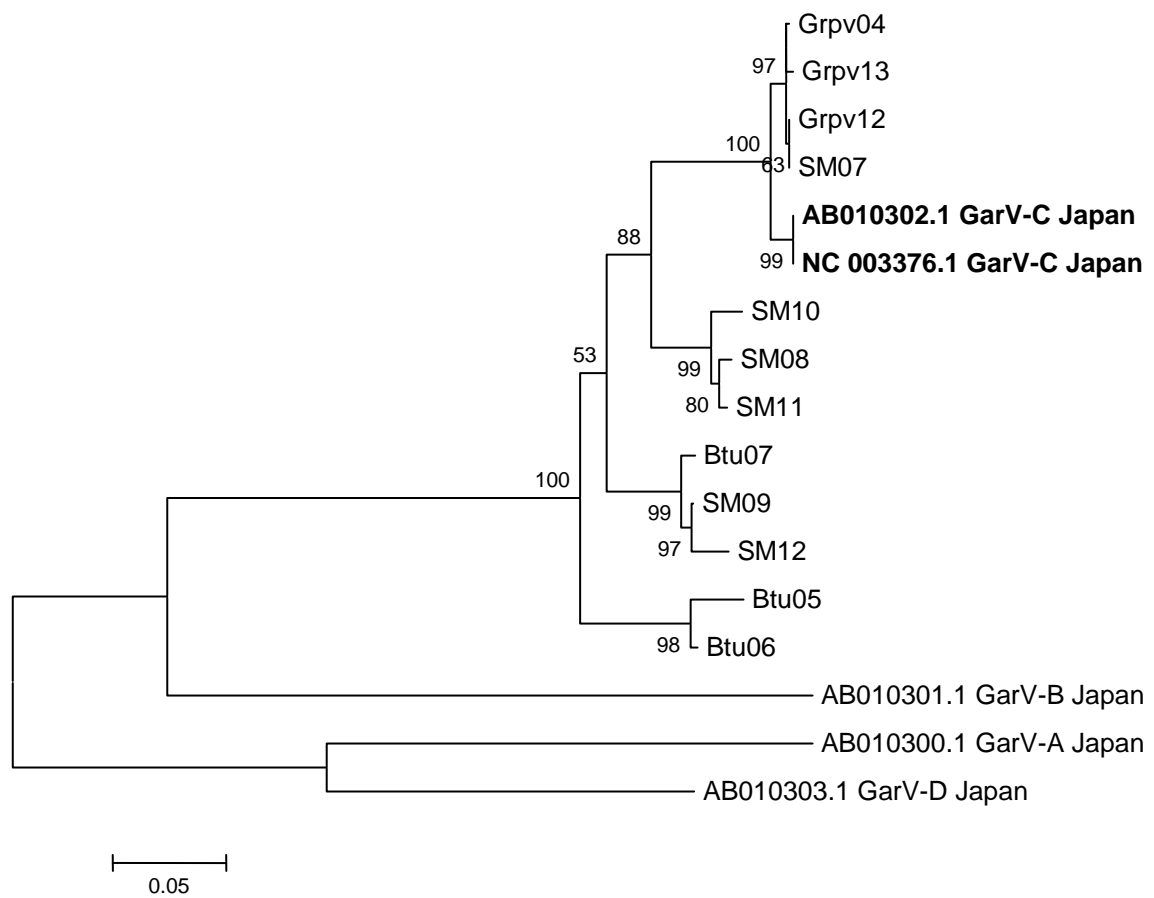


**Figura 8-** Árvore Filogenética da sequência completa de nucleotídeos região codificadora para a proteína capsial de isolados de GarV-B. A árvore foi construída pelo método neighbour-joining com o programa MEGA4.0 Bootstrap (2,000 replicatas).

**Tabela 10.** Porcentagem de identidade de nucleotídeos para a região codificadora para a proteína capsidial de isolados de GarV-B (AB010301.1; AF543829.1; JN0198813.1).

Amostras	SM01	SM02	SM03	SM04	SM05	SM06	Grpv03	AB010301.1	AF543829.1	JN0198813.1
<b>SM01</b>	<b>100</b>	94.0	94.2	93.8	83.1	94.0	94.0	85.0	90.0	84.4
<b>SM02</b>		<b>100</b>	94.3	94.2	83.3	94.3	94.3	85.3	90.4	84.5
<b>SM03</b>			<b>100</b>	94.2	83.3	94.3	94.3	85.3	90.4	84.6
<b>SM04</b>				<b>100</b>	83.2	94.2	94.2	85.4	90.3	84.5
<b>SM05</b>					<b>100</b>	83.0	83.1	85.0	83.0	89.8
<b>SM06</b>						<b>100</b>	94.3	85.3	90.4	84.4
<b>Grpv03</b>							<b>100</b>	85.3	90.4	84.4
<b>AF543829.1</b>								<b>100</b>	85.4	85.5
<b>AB010301.1</b>									<b>100</b>	84.2
<b>JN0198813.1</b>										<b>100</b>

Dentre as doze amostras positivas para GarV-C sequenciadas foi possível verificar que a identidade de nucleotídeos variou de 82,3% a 97,3% para a região codificadora da proteína capsidial. Estes resultados revelam uma alta variabilidade genética entre os isolados de GarV-C. A identidade entre os isolados brasileiros e japoneses (número de acesso AB010302.1 e NC 003376.1) variou entre 82.3% a 97.3%, estando mais próximos filogeneticamente dos isolados Grpv04, Grpv13, Grpv12 e SM07 (Figura 9).

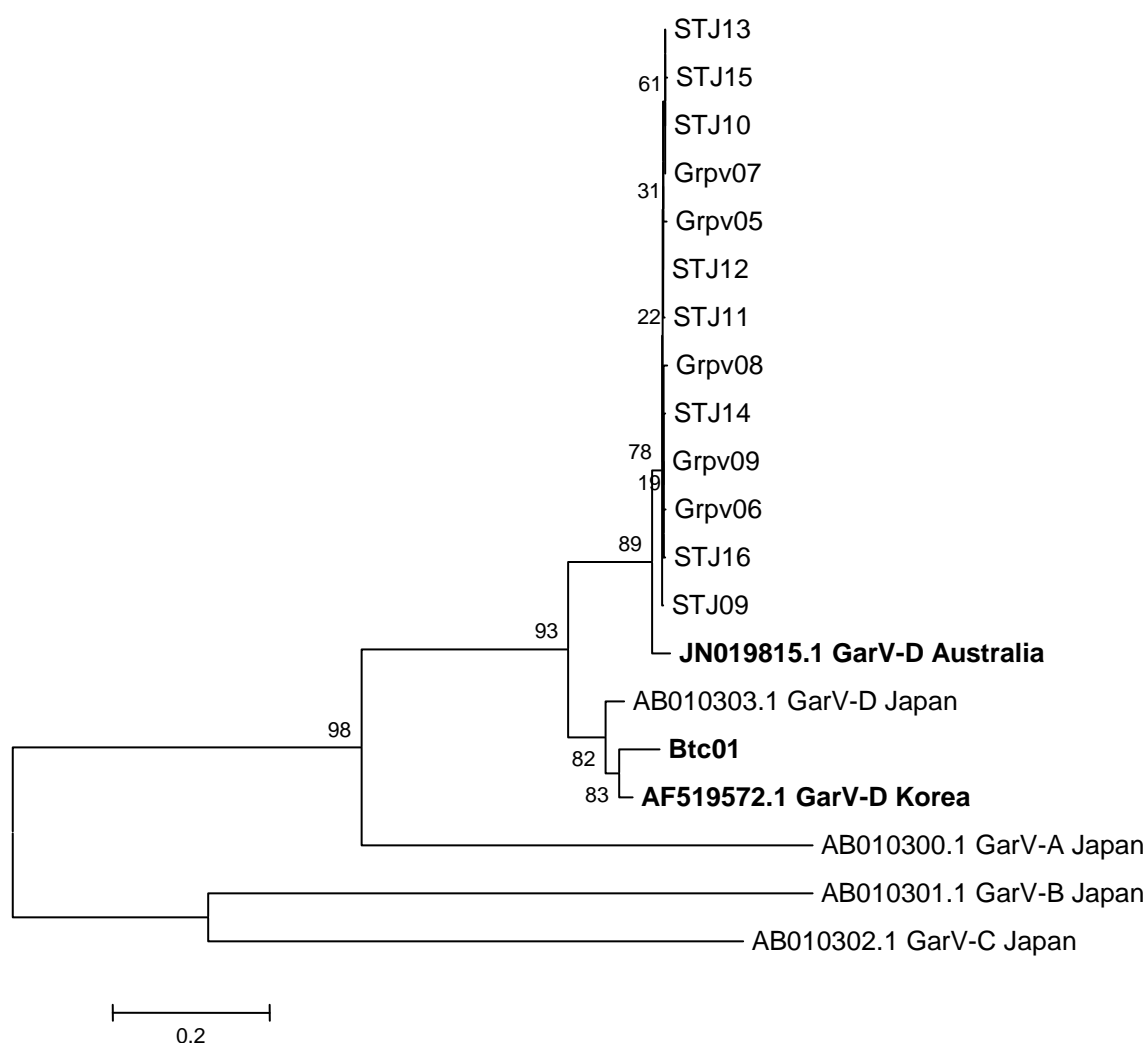


**Figura 9-** Árvore filogenética gerada com a sequência completa de nucleotídeos da proteína capsidial de isolados de GarV-C. A árvore foi construída pelo método neighbour-joining com o programa MEGA4.0 Bootstrap (2,000 replicatas).





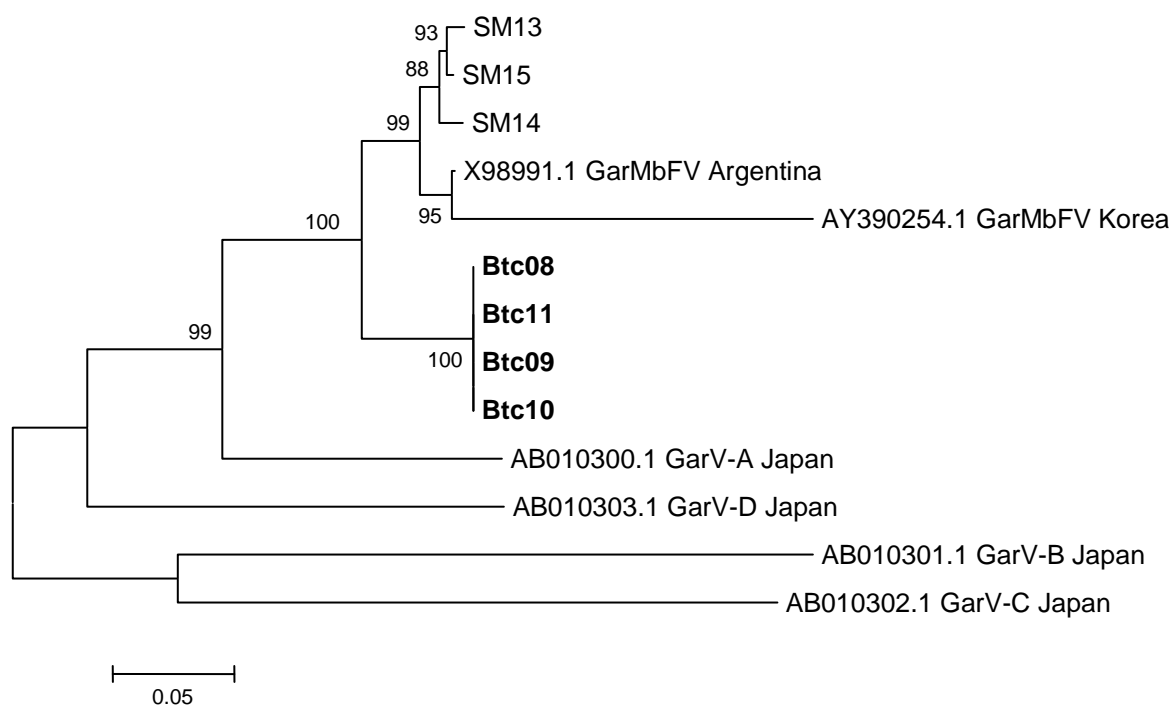
Entre as quatorze sequências de GarV-D obtidas foi verificada identidade de nucleotídeos de 85.6%-95% (Tabela 12). A maioria dos isolados brasileiros apresentaram a maior identidade nucleotídeos (95%) com o isolado australiano (JN019815.1), enquanto que um isolado coletado em Botucatu (Btc01) encontra-se mais próximo filogeneticamente do GarV-D da Coréia (AF519572.1) com 93,5% de identidade de nucleotídeos (Figura 10).



**Figura 10-** Árvore filogenética gerada para a sequência completa de nucleotídeos da capa proteica para isolados brasileiros de GarV-D comparados com sequencias depositadas no GenBank. A árvore foi construída pelo método neighbour-joining com o programa MEGA4.0 Bootstrap (2,000 replicatas).



Entre as sete sequências de GarMbFV obtidas a identidade de nucleotídeos da CP variou de 72.4%-90.7% com isolados depositados no GenBank (Tabela 13). Dois ramos filogenéticos distintos foram formados: um ramo contendo três isolados brasileiros coletados em São Manuel/SP denominados de SM13, SM15 e SM14, que apresentam identidade de nucleotídeos de 90% com isolado da Argentina (X98991.1) e apenas 76% com o isolado proveniente da Coreia (AY390254.1). Os isolados coletados em Botucatu, Btc08, Btc09, Btc10 e Btc11 se agruparam em um ramo filogenético único (Figura 11). Os isolados de GarMbFV apresentaram alta identidade de nucleotídeos (80 a 87%) com isolados de GarV-A. Apesar do critério atualmente aceito pelo ICTV considerar que allexivirus da mesma espécie possuem identidade de nucleotídeos superior a 72% para a sequência de nucleotídeos completa para a porção codificadora da proteína capsial (ADAMS et al, 2011a), GarV-A e GarMbFV são considerados espécies diferentes de allexivirus.

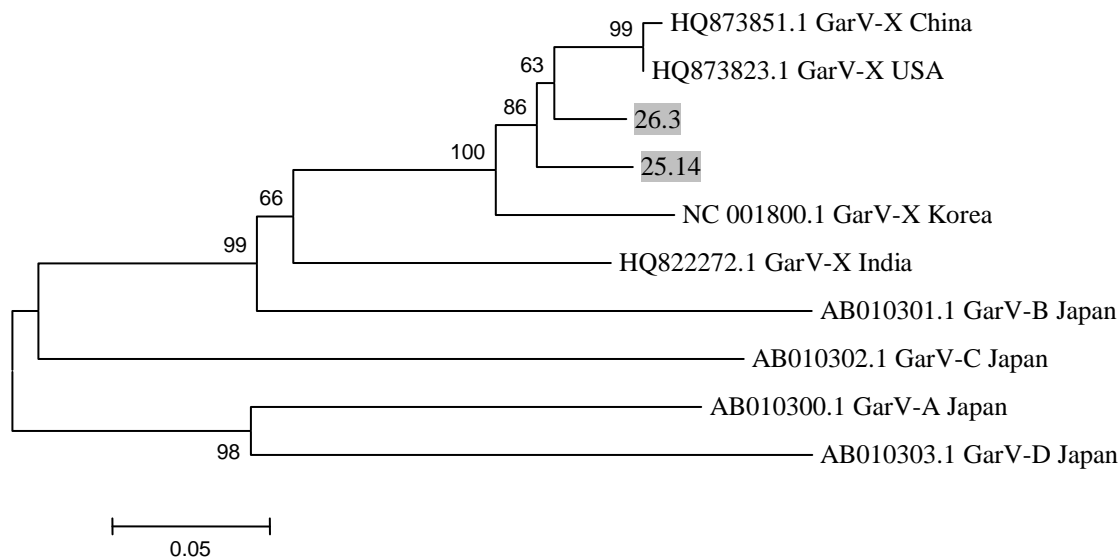


**Figura 11-** Árvore Filogenética para a sequência completa de nucleotídeos codificadora para a proteína capsial de isolados de GarMbFV. A árvore foi construída pelo método neighbour-joining com o programa MEGA4.0 Bootstrap (2,000 replicatas).

**Tabela 13.** Porcentagem de identidade de nucleotídeos para a região codificadora de isolados de GarMbFV (X98991.1; AY390254.1).

<b>Amostras</b>	<b>SM13</b>	<b>SM14</b>	<b>SM15</b>	<b>Btc08</b>	<b>Btc09</b>	<b>Btc10</b>	<b>Btc11</b>	<b>X98991.1</b>	<b>AY390254.1</b>
<b>SM13</b>	100	91.2	92.4	85.0	85.0	85.0	85.0	90.3	76.1
<b>SM14</b>		100	91.7	84.6	84.6	84.6	84.6	90.2	76.4
<b>SM15</b>			100	85.3	85.3	85.3	85.3	90.7	76.6
<b>Btc08</b>				100	93.3	93.3	93.3	84.9	72.4
<b>Btc09</b>					100	93.3	93.3	84.9	72.4
<b>Btc10</b>						100	93.3	84.9	72.4
<b>Btc11</b>							100	84.9	72.4
<b>X98991.1</b>								100	79.4
<b>AY390254.1</b>									100

Os dois isolados de GarV-X encontrados apresentaram maior porcentagem de identidade de nucleotídeos, 93.6% a 95%, com o isolado de GarV-X encontrado nos Estados Unidos (HQ873823.1). A menor porcentagem de identidade foi verificada com um isolado proveniente da Índia (HQ822272.1), na qual compartilharam 81.5-82.5% de identidade de nucleotídeos (Figura 12).



**Figura 12-** Árvore Filogenética para a sequência parcial de nucleotídeos codificadora para a proteína capsidial de isolados GarV-X. A árvore foi construída pelo método neighbour-joining com o programa MEGA4.0 Bootstrap (2,000 replicatas).

Dado o número de sequências completas da região codificadora da proteína capsidial disponíveis para GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D e GarMbFV no GenBank, é difícil correlacionar uma possível origem geográfica de isolados brasileiros de allexivírus. A árvore filogenética para cada vírus sugere que allexivírus encontrados no Brasil, provavelmente, foram introduzidos de diferentes origens geográficas. A comercialização de bulbos de alho importados da Europa, Ásia e Argentina, pode ter um papel importante na introdução do vírus no país (MELO FILHO et al., 2004). Em 1991, Van Dijk et al. relataram a presença de allexivírus em alho originada da China e da Espanha, países exportadores para o Brasil. Parte dos bulbos importados para consumo é frequentemente utilizado como sementes para estabelecer novas culturas, sendo provavelmente o responsável pela introdução de novas doenças no país (MELO FILHO et al., 2004).

#### **6.4. Análise da sanidade vegetal de bulbos de alho submetidos à termoterapia e cultura de meristema.**

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, 5 foram positivas para presença de allexivirus, dos quais três amostras para a espécie GarV-A, uma para GarV-C e uma para GarV-D. Nenhuma foi positiva para potyvirus e carlavirus. A porcentagem de transmissão de allexivirus foi de 6,6%. Estes bulbos apresentavam peso mínimo de 1 grama, peso este desejável após aclimatização e foram selecionados para multiplicação comercial.

Em 2012, 100 plantas de alho mantidas em condições de casa de vegetação em Botucatu, porém em sua quarta geração foram analisadas para a presença de vírus. Destas, 60 foram positivas para presença de allexivirus, 35 com potyvirus e todas negativas para carlavirus. A alta taxa de infecção por allexivirus e potyvirus pode ter várias explicações. Estes bulbos 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; a alta incidência de allexivirus pode estar relacionada a escape durante a termoterapia e cultura de meristema, ou transmissão do vírus pelo ácaro, *A. tulipae*, durante o armazenamento dos bulbos de um ano a outro. Barg et al. (1997) evidenciaram que condições inadequadas de armazenamento de bulbos podem favorecer o acúmulo de população 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.

Vários autores verificaram que os allexivirus são mais difíceis de serem eliminados pela cultura de tecido e termoterapia em alho (CONCI et al., 2004; PEROTTO et al., 2003). Verbeek et al. (1995) obtiveram eficiência de eliminação de somente 54% para allexivirus, enquanto que 100% para LYSV (potyvirus), 92% para OYDV (potyvirus) e 62% para GCLV (carlavirus). Pérez et al. (1997) obtiveram uma

porcentagem de infecção por potyvirus de 17,5% em plantas de alho submetidas à cultura de tecido.

A taxa de infecção por potyvirus (35%) verificada nas plantas da quarta geração indica escape do processo de limpeza por termoterapia. Estes resultados reforçam a necessidade de selecionar os bulbilhos maiores e mais vigorosos para multiplicação do alho, pois estes tem menor porcentagem de infecção por vírus.

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 (CAFRUNE et al., 2006).

O tratamento por termoterapia e cultura de tecido empregado para produção de alho livre de vírus na FCA-Botucatu é um método satisfatório na eliminação de vírus, porém que 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 dos ácaros, *A. tulipae*, enfatizam 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 e vai ser avaliada em nosso laboratório.

## 7. CONCLUSÕES

- Prevalecem as espécies GarV-A e GaV-D nas regiões produtoras de alho analisadas;
- Infecções mistas entre as diferentes espécies de allexivirus ocorrem com frequência;
- Possível introdução no Brasil das espécies GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D e GaMbFV de diferentes regiões geográficas do mundo;
- O *Garlic virus X* não é mais considerado uma espécie de allexivirus exótica no Brasil;
- A metodologia de termoterapia e cultura de meristema do alho hoje estabelecida na FCA possibilita escape de vírus;
- A fumigação no processo de armazenamento dos bulbos é indispensável para evitar a transmissão de allexivirus por ácaros.



## 8. REFERÊNCIAS

ADAMS, M. J.; CANDRESSE, T.; HAMMOND, J.; KREUZE, J. F.; MARTELLI, G. P.; NAMBA, S.; PEARSON, M. N.; RYU, K. H & VAIRA, A. M. Family *Alphaflexiviridae*. In: 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, 2011a. p. 904-907.

ADAMS, M. J.; CANDRESSE, T.; HAMMOND, J.; KREUZE, J. F.; MARTELLI, G. P.; NAMBA, S.; PEARSON, M. N.; RYU, K. H; SALDARELLI, P.; YOSHIKAWA, N. Family *Betaflexiviridae*. In: 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, 2011b. p. 924-927.

ADAMS, M. J.; ZERBINE, F. M.; FRENCH, R.; RABENSTEIN, F., STENGER, D. C.; VALKONEN, J. P. T. Family *Potyviridae*. In: 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, 2011c. p. 1069-1089.

AGRIANUAL. **AGRIANUAL 2012**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2012. p. 154-157.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE ALHO. Consumo de alho no Brasil. 2011. Disponível em: <<http://www.anapa.com.br/>>. Acesso em: 28 nov. 2012.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE ALHO. Consumo de Alho no Brasil, 2012. Disponível em: < <http://www.anapa.com.br/>>. Acesso em 03 dez. 2012.

BARG, E., LESEMANN, D. E., VETTEN, H. J., AND 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.

BERTHEAU, Y., D. *et al.* 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.** Scottish Crop Research Institute Occasional Publication, 1998.

BLACKMAN, R. L; EASTOP, V. F. The crops and their aphids. IN: \_\_\_\_\_. **Aphids on the World's Crops: An identification and Information Guide.** 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 2000. Cap. B, p. 101-101.

BLOCK, E. Garlic and Other Alliums: The Lore and the Science. **The Royal Society of Chemistry**, Cambridge, UK, p. 454, 2010.

BOS, L.; HUTTINGA, H.; MAAT, D.Z. *Shallot latent virus*, a new carlavirus. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.84, p.227-237, 1978.

BREWSTER, J. L. The Classification, Origins, Distribution and Economic Importance of the Major Vegetable Crops. In: \_\_\_\_\_. **Onion and Other Vegetable Alliums.** London: cabi, 2008. p. 1-26.

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.

CARVALHO, M. G. Viroses do alho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 12, n. 142, p. 41-46, 1986.

CHEN, J., ZHENG, H. Y., ANTONIW, J. F., ADAMS, M. J., CHEN, J., AND LIN, L. Detection and classification of allexiviruses from garlic in China. **Archive of Virology**, Vienna, v. 149, p. 435–445, 2004.

CHEN, J.; CHEN, J.; ADAMS, M.J. Molecular characterisation of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. **Archives of Virology**, Vienna, v. 146, p.1841-1853, 2001.

CHUNG, B. Y.-W., MILLER, A.W., ATKINS, J.F., FIRTH, A.E. An overlapping essential gene in the Potyviridae. **PNAS**. v.105, p. 5897–5902, 2008.

CONCI, V.; NOME, S. F.; MILNE, R. G. Filamentous viruses of garlic in Argentina. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, p. 594-596, 1992.

CONCI, V. C.; CAFRUNE, E. E., LUNELLO, P., NOME, S., & PEROTTO, C. **Producción de planas de ajo libres de virus.** In: V. Echenique, C. Rubinstein & L. Mroginski (Eds.), *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal.* Buenos Aires: INTA, p. 313-316, 2004.

DELECOLLE, B.; LOT, H. Viroses de l'ail: mise en evidence et essais de characterization par immunoélectromicroscopie d'un complex de trios virus chez différents populations d'ail atteints de mosaïque, 1981. In: VAN DIJK, P. Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 99, p. 233-257, 1993.

ETOH, T., SIMON PW. Diversity, fertility and seed production of Garlic. In: Rabinowitch HO, Currah L (eds) *Allium crop Science: recent advances*. CABI Publishing, Oxford, 2002. p. 101-117.

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.

FAJARDO, T. V. M.; NISHIJIMA, M.; BUSO, J. A.; TORRES, A. C.; AVILA, A. C.; RESENDE, R. O. Garlic viral complex: identification of potyviruses and carlaviruses in Central Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, n. 3, p. 619-626, set. 2001.

FAYAD-ANDRE, M. S., DUSI, A. N., RESENDE, R. O. Spread of viruses in garlic fields cultivated under different agricultural production systems in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 36, n. 6, p. 341-349, 2011.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2009. Agricultural production: garlic. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 15 dez. 2012.

KANG, S. G., KOO, B. J., LEE, T., AND CHANG, M. U. Allexivirus transmitted by eriophyid mites in garlic plants. **Journal Microbiology Biotechnology**, Seoul, v. 17, p. 1833–1840, 2007.

KATIS, N. I., MALIOGKA, V. I., DOVAS, C. I. Viruses of the Genus *Allium* in the Mediterranean Region. In: Loebenstein, G.; Lecoq, H. **Viruses and Virus Diseases of Vegetables in the Mediterranean Basin**. San Diego: Elsevier, 2012, p. 163-208.

KITAJIMA E.W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. **Journal of Electron Microscopy**, Tokyo, v. 14, p. 119-121, 1965.

KLUKACKOVÁ, J.; NAVRÁTIL, M.; DUCHOSLAV, M. Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v.3, n.4, p.97-100, 2007.

KOENIG, R. Serology and Immunochemistry. In: Milne, R.G. **The Plant Viruses**, v.4, n.4, p.111-137, 1988.

KUMAR S, DUDLEY J, NEI M & TAMURA K 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v. 9, p. 299-306, 2008.

LUNELLO, P., MANSILLA, C., CONCI, V., AND PONZ, F. Ultra-sensitive detection of two garlic potyviruses using a real-time fluorescent (Taqman) RT-PCR assay. **Journal Virology Methods**, Amsterdam, v. 118, p. 15–21, 2004.

LUNELLO, P., DI RIENZO, J., AND CONCI, V. Yield loss in garlic caused by Leek yellow stripe virus Argentinean isolate. **Plant Disease**, St. Paul, v.91, p.153–158, 2007.

MAIA, I. G.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Potyviral HC-Pro: a multifuncinal protein. **Journal of General Virology**, Reading, v.77, p.1335- 1996.

MASSOLA JR., N. S.; JESUS JR., W. C.; KIMATI, H. Doenças do alho de da cebola (*Allium sativum* e *A. cepa*). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4 ed., v. 2. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. Cap. 9, p. 53-63.

MELHUS, I. E., REDDY, C., SHENDERSON, W. J., AND VESTAL, E. A new virus disease epidemic on onions. **Phytopathology**, St. Paul, v. 19, p. 73-77, 1929.

MELO FILHO, P.A.; DUSI, A.N.; BUSO, J.A.; TORRES, A.C.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Degeneration of garlic plants caused by virus infection after five sequential field generations. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.28, n.1, p.141, 2002.

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**, Brasília, DF, v.39, n.8, p.735-740, 2004.

MENEZES SOBRINHO, J.A. ED. CULTIVO DO ALHO (*ALLIUM SATIVUM*). 3. ed. Brasília: EMBRAPACNPH, 1997. 23 p. (Instruções Técnicas da Embrapa Hortaliças, 2).

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 Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu: 2009.

MOHAMED, N. A., AND YOUNG, B. R. Garlic yellow streak virus, a potyvirus infecting garlic in New Zealand. **Annals Applied Biology**, Chichester, v.97, p. 65-74, 1981.

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.

NAKANO, O. et al. Pragas das hortícolas e ornamentais: Liliáceas. IN: \_\_\_\_\_. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. p. 741-743.

NASCIMENTO, R.J.; PIO-RIBEIRO, G., SANTOS, R. C., MELO FILHO, P. A. Detecção de allexivirus em primórdios foliares de alho via RT-PCR. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 3, p.267-269, 2008.

PALUDAN, N. Virus attach on leek. Survey, tolerance, diagnosis of varieties and Winter hardness. **Tidsskr Planteavl**, Lyngby, v.84, p. 371, 1980.

PAVAN, M.A. **Viroses em alho nobre**: identificação, estabelecimento de métodos eficientes para obtenção de plantas livres de vírus, seleção de clones assintomáticos em

campo e avaliação comparativa do desempenho em condições controladas. 1998, 116 f. Tese (Livre- Docência em Fitopatologia Geral)–Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 1998.

PÉREZ, M.L., RAMÍREZ, M.R. Y SALINAS, G.J.G. **Métodos de obtención de plantas de ajo (*Allium sativum* L.) libres de virus (grupo potyvirus) en México.** In: Libro de Resúmenes del IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Montevideo, Uruguay. Resumen, p. 198, 1997.

PEROTTO, M. C., CONCI, V. C, CAFRUNE, E. E., ALOCHIS, P., & BRACAMONTE, R. Differences in the response of garlic cultivars to the eradication of five viruses. **Phyton**, Buenos Aires, p.233-40, 2003.

SATURNINO, H. M.; CRUZ FILHO, J. Doenças da cebola. **Informe Agropecuário**, Minas Gerais, v. 6, n. 62, p. 47-59, 1980.

SOBRINHO, J. A. M.; LOPES, C. A.; REIFSHNEIDER, F. J. B.; CHARCHAR J. M.; CRISÓSTOMO, L. A.; CARRIJO, O. A.; BARCOSA, S. **A cultura do alho.** Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. Brasília, 1993.

SOUZA, R. J., MACÊDO, F. S. Botânica e Cultivares. In: \_\_\_\_\_. **Cultura do alho: Tecnologias Modernas de Produção.** Lavras: UFLA, 2009. p. 21-37.

TSUNEYOSHI, T.; MATSUMI, T.; NATSUAKI, K. T.; SUMI, S. Nucleotide sequence analysis of virus isolates indicates the presence of three potyvirus species in *Allium* plants. **Archive of Virology**, Vienna, v.143, p.97-113, 1998.

URCUQUI-INCHIMA, S., HAENNI, A. L. & BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**, Amsterdam, v. 74, p. 157–175, 2001.

VAN DIJK, P., VERBEEK, M., AND BOS, L. Mite-borne virus isolates from cultivated *Allium* species, and their classification into two new rymoviruses in the family Potyviridae. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 97, n. 6, p.381–399, 1991.

VAN DIJK, P. Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 99, p. 233-257, 1993a.

VAN DIJK, P. Survey and characterization of potyviruses and their strains of *Allium* species. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 99, n. 2, p. 1–48, 1993b.

VEGA, J., KUNIYUKI, H. Aperfeiçoamento da técnica de MEID para detecção do vírus do mosaico do Traviú. **Summa Phytopathologica**, Resumo, v.12, p14, 1986.

VIRALZONE: a knowledge resource to understand virus diversity. Carlavirus. 2011. Disponível em: <[http://viralzone.expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/268.html](http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/268.html)>. Acesso em: 15 dez. 2012.

VIRALZONE: a knowledge resource to understand virus diversity. Allexivirus. 2011. Disponível em: < [http://viralzone.expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/266.html](http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/266.html)>. Acesso em: 15 dez. 2012.

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.

WALKEY, D.G.A.; WEBB, M.J.W.; BOLLAND, C.J.; MILLER, A. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.62, p.211-220, 1987.

WYLIE, S. J., LUO, H., LI, H., JONES, M. G. K. Multiple polyadenylated RNA viruses detected in pooled cultivated and wild plant samples. **Archive Virology**, Vienna, v. 157, n. 2, p. 271-284, 2012.

YAMASHITA, K., SAKAI, J., AND HANADA, K. Characterization of a new virus from garlic (*Allium sativum* L.), garlic mite-borne mosaic virus. **Annals Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 62, p. 483-489, 1996.

ZAMBOLIN, L. *et al* (Eds). Manejo **Integrado de Doenças e Pragas Hortaliças**. Editora UFV: Viçosa - MG, 2007, p. 627.

## APÊNDICE 1

Alinhamento da região codificadora para a proteína capsidial de diferentes espécies de *Allexivirus*, e localização dos quatro oligonucleotídeos universais desenhados. Em azul o Cpallexi-senso1, em amarelo Cpallexi-senso2, em vermelho o Cpallexi-anti1 e em verde o Cpallexi-anti2. AB010300, AF478197 e X98991: GarV-A; AB010301 e AF543829: GarV-B; AB010302 e D49443: GarV-C; AB010303, AF519572, L38892: GarV-D; AJ292230: GarV-E; AJ292229 e U89243: GarV-X; M97264, L76292: ShVX.

```

AB010300      -ATGCAAGNGACGACTCCGACGCACTCATGCCCGCTGTGACCGACTTTGAGACTCTCACT  59
AF478197     -ATGCAAGTGACGACTCCGACGCACTCATGCCCGCTGTGACCGACTTCGAGACTCTCACT  59
X98991       -ATGCGAGTAACGAATCCGATGAACCTCATGCCCGCTCTAGCTGAATTCGAAAACCTGACG  59
AJ292230     TGGGCACG-AACGAACAGAATGACCTGATGCCCTGCAGTGAATGATTTTCGAGGCTCTGACA  59
AF519572     -CAATTACCAATGAACAGGATGAGCTGATGCCCGCGTAAACGAATTCGAAAATCTGGCT  59
L38892       -CAATTACCAATGAACAGGATGAGCTGATGCCCGCGTAAACGAATTCGAAAATCTGGCT  59
AB010303     -CAATTACCAATGAACAGGATGAACCTAATGCCCGCGTAAACGAATTCGAAAATCTGGCT  59
AB010301     -CTGACTTGAATGCTCAGGACAACATCATGCCCGTAAACGAATGACCTTGCCTGCAATCGCC  59
AF543829     -CTGACTTGAATGCCAAGACAACATTTATGCCCGTAAACGAATGACCTTGCCTGCAATCGCC  59
AJ292229     -CTGACTTAAACGCCAGACAATGTCATGCCCTTCTGAAAATGACTTAGCAGCGATAGCA  59
U89243       -CTGACTCAAATGCCAGAACTCTATAATGCCCTTCTGAAAATGACTTAGCAGCGATAGCA  59
AB010302     -GTGGACCGACTGTCACAAATGAATGTTGCGCGAGTGAGTCTGAGCTGGAGGCGGTAGCG  59
D49443       -GTGGACCGACTGTCACAAATGAATGTTGCGCGAGTGAGTCTGAGCTGGAGGCGGTAGAG  59
M97264       -CTGAATCGAGTAATCAGGATGAACCTATTGCCCGTAAACGAATGACCTTGCCTGCAATCGCC  59
L76292       -CTGAATCGAGTAATCAGGATGAACCTATTGCCCGTAAACGAATGACCTTGCCTGCAATCGCC  59

```

\* \* \* \* \*

```

AB010300      AAAGATGTGCGAATCCAACCTCAGTCGCTTCAAGGTTAATTATTTCGCGACATACTTGACATG  119
AF478197     AAAGATGTGCGAATCCAACCTCAGTCGCTTCAAGGTTAATTATTTCGCGACATACTTGACATG  119
X98991       AAGGATGTGCGAATCTAATTCAGTCGCTTCAAGAACAATTTATTCGAGAAATACTCGACCTG  119
AJ292230     GCAGATGTAGAGTCTAACTCAGTTGCGTCAAGAACAACCGTGCAGGAAATCTTAGACATG  119
AF519572     AATGACGTCGAGTCAAACCTCAATAGCTTCAAGAGCGACTATAAGAGATATCCTGGACATG  119
L38892       AATGACGTTGAGTCAAACCTCAATAGCTTCAAGAGCGACTATAAGAGATATCCTGGACATG  119
AB010303     AACGACGTCGAGTCAAACCTCACTAGCTTCAAGAGCGACTATAAGAGATATCCTGGATATG  119
AB010301     GCGGAAGTAACGTCGAATTCGTTGCTACCAAAGAGACGGTAAAGAAATCTCAGCGAT  119
AF543829     GGTGAAGTAACATCCAATTCGTTGCTACCAAAGAGACGGTAAAGAAATCTTAGCACC  119
AJ292229     AGTGATGTAATTTCAAACCTCAGTAGCCACACAGGAGACTATCCGTGAAATCCTCAGCACC  119
U89243       AGTGACGTAACCTCCAATTCAGTAGCCACACAGGAGACTATCCGGGAAATCCTCAGCACC  119
AB010302     AATGACGTCACATCGAATTCGTTAGCTACACAGAGCACAATTCGCGAAATCCTAGACCTA  119
D49443       AATGACGTCACATCGAATTCGTTAGCTACACAGAGCACAATTCGCGAAATCCTAGACCTA  119
M97264       AGCGACGTGGAGTCCAATTCGTTAGCACCACAAAGCCACCATTTCGCGAAATCCTGGACACC  119
L76292       AGCGACGTGGAGTCCAATTCGTTAGCACCACAAAGCCCTCATTTCGCGAAATCCTGGACACC  119

```

\* \* \* \* \*

```

AB010300      CTACAAGCCAAGCGACAAGGAGCCACCCCAAAGACCTTTTCTCCTAGCTTGGACCTGC  179
AF478197     CTACAAGCCAAGCGACAAGGAGCCACCCCAAAGACCTTTTCTCCTAGCTTGGACCTGC  179
X98991       CTACAAGCCAACGACAAGGAGCGACCCCGAAAGATCTCCTCTCCCTAGCGTGGACTTGC  179
AJ292230     CTACAAGCCAAGCGTCAAGGAGCCACACCGAAAGACTATTCTCCTTGCCTGGACTTGC  179
AF519572     CTGCAAGCAACCAGGCAAGGAGCTACACCGAAGGACCTCTTTTCCCTAGCTTGGGCGTGC  179
L38892       CTGCAAGCAACCAGGCAAGGCGCAACACCGAAGGACCTCTTTTCTTTAGCTTGGACGTGC  179
AB010303     CTACAAGCAACCAGGCAAGGAGCTACACCGAAGGACCTCTTTTCTTTAGCTTGGACGTGC  179
AB010301     CTCCAAGCAAGGAGGACTAACGCTACACCTAAAGATTTATTTTCTAGCTTGGGCTTGC  179
AF543829     CTCCAGGCGAGGAGAATAACGCCACACCTAAAGACTTATTTTCGCTTGGGCTTGC  179
AJ292229     CTTCAAGCAAGGCGACCCAATGCAACCCCAAAGACTTATTTTCGCTTGGGCTTGC  179
U89243       CTTCAAGCGAGCGGCGCCGCTGCACACCCCAAAGACTTGTTTTCTAGCTTGGGCTTGC  179
AB010302     CTTTCGCGCAGCAAGCCAAGCGCTACGCCAAAAGACCTCTTTTCCCTTGCATGGGCTTGC  179
D49443     CTTTCGTCACGCAAGCCAACGCTACGCCAAAAGACTCTTTTCCCTTGCATGGGCTTGC  179
M97264     TTACAAGCTAAGAGGCAAAAACGCCACCCCGAAAGATCTATTCTCATTAGCCTGGGCTTGC  179
L76292     TTACAAGCTAAGAGGCAAAAACGCCACCCCGAAAGATCTATTCTCATTAGCCTGGGCTTGC  179

```

\* \* \* \* \*

```

AB010300      TACCACAACGGTTTCATCGCGATTTGTTACCCTGACCACTGACGCGCCTTGCGGCATGGCG  239
AF478197     TACCACAACGGTTTCATCGCGATTTGTTACCCTGACTACTGACGCGCCTTGCGGCATGGCG  239

```





AB010300 GCGACTCTTCTCCGAGTCTCTCCCGGAGGTATGAGATTTAAACCTACAGACGCCGAAATCC 479  
 AF478197 GCGACTCTTCTCCGAGTCTCTCCCGGAGGTATGAGATTTAAACCTACAGACGCCGAAATCC 479  
 X98991 GTGACTCCTCTCCTAACCCCTGGAGGCATGAGATTTCAAACCCACAGATGCTGAAATTC 479  
 AJ292230 GTGATTCCTCACCAGTTCGCGCCGGAGGTATGAGGTTCAAACCTACAGATGCGGAAATTC 479  
 AF519572 GTGACTTTTCCCTGCCCCACCTGGAGGAATGAGATTTCAAACCCACTGACGCTGAAATTC 479  
 L38892 GTGACTTTTCCCTGGGCCACCTGGAGGAATGAGATTTCAAACCCACTGAGGCTGAAATTC 479  
 AB010303 GCGACTTTTCCCTGCCCCACCTGGAGGAATGAGATTTCAAACCCACTGACGCCGAAATTC 479  
 AB010301 ACGACTCCTCCCCGCCCCGCCGGTGGCATGCGTTTCAAACCAACACAAGATGAGATTT 479  
 AF543829 GCGACTCTTCTCCCCCCCCCGGTGGCATGCGTTTCAAACCCACGCAAGACGAGATTT 479  
 AJ292229 GCGACTCGTCCCCAACACCACCTGGCGGCATGCGGTTCAAACCAACACATGAGGAGATTG 479  
 U89243 GCGACTCGTCTCCACACCACCTGGTGGTATGCGATTTAAACCAACCCATGAGGAGATTG 479  
 AB010302 GCGACTCAGCCCCAAACCCTCCTGGCGGCATGCGCTTTAAACCTACGCAAGCAGAAATTC 479  
 D49443 GCGACTCAGCCCCAAACCCTCCTGGCGGCATGCGCTTTAAACCTACGCAAGCAGAAATTC 479  
 M97264 GTGAGTCTTCCCCAGCTCCACCGGGCGGAATGCGGTTCAAACCCACGCAAGCTGAAATTC 479  
 L76292 GTGAGTCTTCCCCAGCTCCACCGGGCGGAATGCGGTTCAAACCCACGCAAGCTGAAATTC 479  
 \* \* \* \* \*

AB010300 TCGCGCATTCTATGAATGCTAAGATGTCTATTGTTGAATCTAGGCGGCCACCAACATGG 539  
 AF478197 TCGCGCATTCTATGAATGCTAAGATGTCTATTGTTGAATCTAGGCGGCCACCAACATGG 539  
 X98991 TCGCACATTCCATGAACGCCAAGATGTCCATTGTGGAGTCCAGACGAGCCACTAATATGG 539  
 AJ292230 TTGGCCACTCCATGAACGCTAAGATGTCTATCGTTGAATCTCGCCGCGCTAGCAACATGG 539  
 AF519572 TTGCTCACTCCATGAACGCTAAGATGTCAATTGTGGAATCCCGCCGGTCCAGCAACATGG 539  
 L38892 TTGCTCACTCCATGAACGCTAAGATGTCAATTGTGGAATCCCGCCGGTCCAGCAACATGG 539  
 AB010303 TTGCTCACTCCATGAACGCTAAGATGTCAATTGTGGAATCCCGCCGGTCCAGCAACATGG 539  
 AB010301 TAGGTCATTCCATGAACGCCAAAAATGTCCATAATTGAATCCCGCAAGGCATCAAACATGG 539  
 AF543829 TAGGTCATTCCATGAACGCCAAAAATGTCCATAATCGAGTCACGCAAAGCATCAAACATGG 539  
 AJ292229 TGGGACACTCCATGAACGCGAAGATGTCCATCATTGAGTCGCGTAAAGCATCAAATATGG 539  
 U89243 TGGGACACTCCATGAACGCGAAGATGTCCATTATCGAGTCACCGAAAGCCTCGAATATGG 539  
 AB010302 TTGGGCACTCCCTGAACGCGAAAAATGTCAATCAGAGTCACGCAAGGCTACCAACATGG 539  
 D49443 TTGGGCACTCCCTGAACGCGAAAAATGTCAATCAGAGTCACGCAAGGCTACCAACATGG 539  
 M97264 TCGGCCACTCAATGAACGCTAAAAATGTCCATAGTCGAGTCCCGCCAATCATCGCACATGG 539  
 L76292 TCGGCCACTCAATGAACGCTAAAAATGTCCATAGTCGAGTCCCGCCAATCATCGCACATGG 539  
 \* \* \* \* \*

## APÊNDICE 2

Alinhamento da região codificadora para a proteína capsidial de espécies de *GarV-B*, e localização dos sete oligonucleotídeos desenhados. Em azul escuro o CPBS1, em amarelo CPBS2, em vermelho o CPBS3, em verde o CPBS4, em roxo o CPBA1, em cinza o CPBA2 e em azul claro CPBA3. AJ551479.1, AJ551481.1, AJ551482.1, AF543829.1 e AB010301.1: *GarV-B*.

```

AJ551479.1      TGGGCTTGCTACCACAACGGGTCTTCAAATTTACAACCTTGACCACGGACGCCCCCTGT
AJ551481.1      TGGGCGTGCTACCACAACGGGTCTTCAAATTTACAACCTTGACCACGGACGCCCCCTGT
AJ551482.1      TGGGCATGCTACCACAACGGGTCTTCAAATTTACAACCTTGACCACGGACGCCCCCTGT
AF543829.1      TGGGCCTGCTACCACAATGGATCATCAAAGTTCACGACTTTAACCACGGACGCTCCTTGC
AB010301.1      TGGGCTTGCTACCACAATGGATCATCAAATTTACGACTTTGACCACGGACGCCCCCTGC
*****
AJ551479.1      GGCATACCTCATGCTGAACTCAAGGACTTAGTCGAGGATTATTGCACGTTGAGACAATTT
AJ551481.1      GGCATACCTCATGCTGAACTCAAGGACTTAGTCGAGGATTATTGCACGTTGAGACAATTT
AJ551482.1      GGCATACCTCATGCTGAACTCAAGGACTTAGTCGAGGATTATTGCACGTTGAGACAATTT
AF543829.1      GGTATACCTCATGCTGAACTCAAGGACTTAGTCGAGGACTATTGCACACTGAGACAGTTT
AB010301.1      GGCATACCTCATGCTGAACTCAAGGACTTAGTCGAGGACTATTGCACACTGAGACAGTTT
*****
AJ551479.1      TGTGGATACTACGCCAAAACATGCTATGTGACGGGCAAACAGCAGAATAAGCCCCCTTCA
AJ551481.1      TGTGGATACTACGCCAAAACATGCTATGTGACGGGCAAACAGCAGAATAAGCCCCCTTCA
AJ551482.1      TGTGGATACTACGCCAAAACATGCTATGTGACGGGCAAACAAGCAGAATAAGCCCCCTTCA
AF543829.1      TGTGGATATTATGCCAAAACATGCTACGTGACGGGCAAACAGCAGAATAAGCCCCCTTCA
AB010301.1      TGTGGATACTACGCCAAGACATGCTACGTGATGAGGATACTGAGGATACTGAGGATACTG
*****
AJ551479.1      AATTGGTCGCGTAAAGGGTTCCAGGAGGAGTCAAATTTTCAGCATTTGACTTCTTCAAT
AJ551481.1      AATTGGTCGCGTAAAGGGTTCCAGGAGGAGTCAAATTTTCAGCATTTGACTTCTTCAAT
AJ551482.1      AATTGGTCGCGTAAAGGGTTCCAGGAGGAGTCAAATTTTCAGCATTTGACTTCTTCAAT
AF543829.1      AACTGGTCACGTAAGGGTTCCAGGAAGAATCAAATTTCTCGGCTTTTGATTTCTTCAAT
AB010301.1      AACTGGTCGCGTAAAGGGTTCCAGGAAGAATCAAATTTCTGCTTTTGATTTCTTCAAT
*****
AJ551479.1      GCTGTACTTAGCGACTCTTCTCCCGCCCCCTCCTGGTGGTATGCGCTTTAAACCAACACAA
AJ551481.1      GCTGTACTTAGCGACTCTTCTCCCGCCCCCTCCTGGTGGTATGCGCTTTAAACCAACACAA
AJ551482.1      GCTGTACTTAGCGACTCTTCTCCCGCCCCCTCCTGGTGGTATGCGCTTTAAACCAACACAA
AF543829.1      GCCGTGCTTAGCGACTCTTCTCCCGCCCCCGGTTGGCATGCGTTTCAAACCCACGCAA
AB010301.1      GCTGTGCTTAAACGACTCCTCCCGCCCCCGGTTGGCATGCGTTTCAAACCAACACAA
*****
AJ551479.1      GATGAGATTTTAGGCCACTCCATGAACGCCAAAATGTCTATAATTGAGTCACGCAAAGCA
AJ551481.1      GATGAGATTTTAGGCCACTCCATGAACGCCAAAATGTCTATAATTGAGTCACGCAAAGCA
AJ551482.1      GATGAGATTTTAGGCCACTCCATGAACGCCAAAATGTCTATAATTGAGTCACGCAAAGCA
AF543829.1      GACGAGATTTTAGGTCATTCCATGAACGCCAAAATGTCTATAATTGAGTCACGCAAAGCA
AB010301.1      GATGAGATTTTAGGTCATTCCATGAACGCCAAAATGTCTATAATTGAGTCACGCAAAGCA
*****
AJ551479.1      TCAAACATGGTCTCCACTCGCGCAGACTTGTTAGCACAACAACAGATTACAGAGGCGCCG
AJ551481.1      TCAAACATGGTCTCCACTCGCGCAGACTTGTTAGCACAACAACAGATTACAGAGGCGCCG
AJ551482.1      TCAAACATGGTCTCCACTCGCGCAGACTTGTTAGCACAACAACAGATTACAGAGGCGCCG
AF543829.1      TCAAACATGGTCTCCACTCGCGCAGACTTGTTAGCACAACAACAGATTACAGAGGCGCCG
AB010301.1      TCAAACATGGTCTCCACTCGCGCAGACTTGTTAGCACAACAACAGATTACAGAGGCGCCG
*****
AJ551479.1      AAACCGCTCATGCTCACATTTTAGAAATTCCTGACCCA-AAATGCATCCCTACGATTTCA
AJ551481.1      AAACCGCTCATGCTCACATTTTAGAAATTCCTGACCCA-AAATGCATCCCTACGATTTCA
AJ551482.1      AAACCGCTCATGCTCACATTTTAGAAATTCCTGACCCA-AAATGCATCCCTACGATTTCA
AF543829.1      AAACCGCTCATGCTCACATTTTAGAAATTCCTGACTCCGAAATGCATCCCTACGATTTCA
AB010301.1      AAACCGCTCATGCTCACATTTTAGAAATTCCTGACTCCGAAATGCATCCCTACGATTTCA

```

```

*****
AJ551479.1  ACTTCTTAGCCTGTCTACAATTTGCTCAACCCAATCTTCCAAGCGATATTAGGACTAGTA
AJ551481.1  ACTTCTTAGCCTGTCTACAATTTGCTCAACCCAATCTTCCAAGCGATATTAGGACTAATA
AJ551482.1  ACTTCTTAGCCTGTCTACAATTTGCTCAACCCAATCTTCCAAGCGATATTAGGACTAATA
AF543829.1  ACTTCTTAGCCTGTTTACAATTTGCTCAACCCAATCTCCAAGCGATATTAGAACTAGTA
AB010301.1  ACTTCTTAGCCTGTTTACAATTTGCTCAACCCAACCTCCAAGCGATGTTAGAATTAGTA
*****

AJ551479.1  TATATATTTTATCTTCTGCAAGTAGGAAATTAGGTCGTAATCTCAACAGAATAAACCCCT
AJ551481.1  TATATATTTTATCCTCTGCAAGTAGGAAATTAGGTCGTAATCTCAACAGAATAAACCCCT
AJ551482.1  TATATATTTTATCTTCTGCAAGTAGGAAATTAGGTCGTAATCTCAACAGAATAAACCCCT
AF543829.1  TATATATATTATCTTCTGCAAGTAGGAAAGCTAGGTCGTAATCCCAACAGAATAAACCCCT
AB010301.1  TATATATGTTATCCTCTGCTAGTAGGAAATAGGTCGTAATCCCAACAGAATAAACCCCT
*****

AJ551479.1  TTACTGGGACGTCGAAATGTGCGAGCCCGCCGTAGAGCAAAACGTTACAACCGGTGTTTTG
AJ551481.1  TTACTGGGACGTCGAAATGTGCGAGCCCGCCGTAGAGCAAAACGTTACAACCGGTGTTTTG
AJ551482.1  TTACTGGGACGTCGAAATGTGCGAGCCCGCCGTAGAGCAAAACGTTACAACCGGTGTTTTG
AF543829.1  TTACTGGGACGTCGAAAGTGCAGCTCGCCGTAGAGCAAAACGGTATAACCGGTGTTTTG
AB010301.1  TC ACTGGGACGT CGAAATGTGCGAGCCCGCCGTAGAGCAAAACGCTATAACCGGTGTTTTG
* ***** ** * * * * * *****

AJ551479.1  ATTGCGGTGCTCTGTTAACCACCTGACCACGTATGTAAATTATTCACAAGTCGAGCCAGTA
AJ551481.1  ATTGCGGTGCTCTGTTAACCACCTGACCACGTATGTAAATTATTCACAAGTCGAGCCAGTA
AJ551482.1  ATTGCGGTGCTCTGTTAACCACCTGACCACGTATGTAAATTATTCACAAGTCGAGCCAGTA
AF543829.1  ACTGCGGCGCCTTGCTGAACACCGACCACGTATGTAAATTATTCACAAGTCGAGCCAGTA
AB010301.1  ATTGCGGTGCCTTGCTGAACACCTGACCACGTATGTAAATTATTCACAAGTCGAGCCAGTA
* ***** ** * * * * * *****

AJ551479.1  CAGACTGCTTACATGTCATTCATGAAGGACCCGCTAAGCTATATGCTGAAAGG
AJ551481.1  CAGACTGCTTACATGTCATTCATGAAGGACCCGCTAAGCTATATGCTGAAAGG
AJ551482.1  CAGACTGCTTACATGTCATTCATGAAGGACCCGCTAAGCTATATGCTGAAAGG
AF543829.1  CAGACTGCTTACATGTCATTCATGAAGGACCCGCTAAGCTATATGCTGAAAGG
AB010301.1  CAGACTGCTTACACGTCATTCGTGAAGGACCCGCTAAGCTATATGCTGAAAGG
*****

```

### APÊNDICE 3

Alinhamento da região completa codificadora para a proteína capsidial de espécies de *GarV-B*, e localização dos sete oligonucleotídeos desenhados. Em azul escuro o GARV-BS1, em amarelo GARV-BS2, em vermelho o GARV-BA1 e em verde o GARV-BA2. JN019813.1, AB010301.1 e AF543829.1: *GarV-B*.

```

JN019813.1      ACGACGGTGCATTATTGCTCGCTGAGGAGATCAGAACGCCTCACAACTCAATCAGCCAC
AB010301.1      ATGACGGGGCCTTATTGCTCACTGAGGAGATTAAACCGCTCTACAACTCAATCANCCAC
AF543829.1      -----

JN019813.1      TTAGCGATTCCCTTAGCACTTCTACACTCCAAATGTCCAATTTTCATTTATAAAAATCAGGG
AB010301.1      TTAGCGATTCACTAGCACTCCTACACTCCAAATGTCCAATTTTCATTTACAAAATTAGGG
AF543829.1      -----AGCACTTTTACACTCCAAATGCCCCAATTTTCATTTATAAAAATCAGGG
                *****

JN019813.1      ATGATGGTTTTGTGTTAAGTTTTGGATTGGGTTGAATTAATTTAAACCGACTTAGAAACAC
AB010301.1      ACGATGGTTTTGTGTTAAGTTTTGGACTTGGGTTGAATTAATTTACACTGGCTTAGAAACAC
AF543829.1      ATGATGGCTTGTGTTAAGTTTTGGACTTGGGTTGAATTAATTTAGACTAGCTTTAAACTAC
                * *****

JN019813.1      GATGGGAGACAGGTCGCAAGGAACAAATCCGTCCCAAGGACTCAACGCTCAAGTGCAGGG
AB010301.1      AATGGGAGACAGGTCACAAGGAACAAATCCGATCCAAGGACTCAATGCTCAAGCGCAGGG
AF543829.1      GATGGGAGACAGGTCGCAAGGGACTAACCCGAACCAAGGACTCAACGCTCAAGCGCAGGG
                *****

JN019813.1      AGACGGGACAAGCGGTCAAGAGTCAACGCAACCCAAACAGAAATCCACCGCTAGACCTCA
AB010301.1      AGACGGGTCAAGCGGTCAAGAGCCAACGCAATCCAAACAGAAACCCACCGCTAGACCTCA
AF543829.1      AGACGGGACAGGTGGTCAAGAGTCAACGCAATCCAAACAGAAATCCACCGCTAGACCTCA
                *****

JN019813.1      AGCTGACTTGAATGCTCAGGACAACATCATGCCAGTGAAAATGACCTTGCCGCAATTCGC
AB010301.1      AGCTGACTTGAATGCTCAGGACAACATCATGCCAGTGAAAATGACCTTGCCGCAATTCGC
AF543829.1      AGCTGACTTGAATGCCAAGACAACATTATGCCAGTGAAAATGACCTTGCCGCAATTCGC
                *****

JN019813.1      CGGTGACGTGACATCTAACTCTGTCGCTACCAAGGAAACGGTGAAAGAAATTTTCAGCAC
AB010301.1      CGGCGAAGTAACGTCCAATTTCTGTTGCTACCAAGAGACGGTGAAAGAAATTTTCAGCGA
AF543829.1      CGGTGAAGTAACATCCAATTTCTGTTGCTACCAAGAGACGGTGAAAGAAATTTCTTAGCAC
                *** **

JN019813.1      CCTCCAAGCTAGGAGGAGTAACGCCACACCTAAAGACCTATTTTCACTTGCTTGGGCTTG
AB010301.1      TCTCCAAGCAAGGAGGACTAACGCTACACCTAAAGATTTATTTTCACTTGCTTGGGCTTG
AF543829.1      CCTCCAGGCGAGGAGAACTAACGCCACACCTAAAGACTTATTTTCGCTTGCTTGGGCTTG
                *****

JN019813.1      CTACCACAATGGATCATCAAAGTTTACGACTTTAACCACGGACGCTCCCTGCGGCATGCC
AB010301.1      CTACCACAATGGATCATCAAATTCACGACTTTGACCACGGACGGCCCTTGCGGCATACC
AF543829.1      CTACCACAATGGATCATCAAAGTTTACGACTTTAACCACGGACGCTCCCTGCGGTATACC
                *****

JN019813.1      TCATGCCGAACTCAAGGATTTAGTTGAGGATTACTGCACGCTGAGACAATTTTGTGGATA
AB010301.1      TCATGCCGAACTCAAAGACTTAGTCGAGGATTATTTGTACGCTAAGACAGTTTTTGTGGATA
AF543829.1      TCATGCTGAACTCAAGGACTTAGTCGAGGACTATTGCACACTGAGACAGTTTTTGTGGATA
                *****

JN019813.1      CTACGCGAAAACATGCTATGTAACGGGCAAACAGCAGAATAAGCCCCCTTCAAACGGTGC
AB010301.1      CTACGCCAAGACATGCTACGTGATGGGCAAACAGCAGAATAAGCCCCCTTCAAACGGTGC
AF543829.1      TTATGCCAAAACATGCTACGTGACGGGCAAACAGCAGAATAAACCCTTCAAACGGTGC
                ** **

```

JN019813.1 GCGTAAAGGGTTCCAAGAAGAATCAAAATTTTCGGCGTTTGACTTCTTCAACGCTGTGCT  
 AB010301.1 GCGTAAAGGGTTCCAGGAAGAATCAAAATTTTCGCTTTTGATTTCTTCAATGCTGTGCT  
 AF543829.1 ACGTAAAGGGTTCCAAGAAGAATCAAAATTTCTCGGCTTTTGATTTCTTCAATGCCGTGCT  
 \*\*\*\*\*  
 JN019813.1 TAGCGACTTCTTCCCGCCCTCCTGGTGGCATGCGTTTCAAACCAACACAAGATGAGAT  
 AB010301.1 TAACGACTCCTCCCCGCCCGCCGGTGGCATGCGTTTCAAACCAACACAAGATGAGAT  
 AF543829.1 TAGCGACTTCTTCCCCCCCCCGGTGGCATGCGTTTCAAACCCACGCAAGACGAGAT  
 \*\*\*\*\*  
 JN019813.1 TTTGGGTCACTCCATGAACGCCAAAATGTCTATAATTGAGTCACGCAAGGCATCAAACAT  
 AB010301.1 TTTAGGTCATTCCATGAACGCCAAAATGTCCATAATTGAATCCCGCAAGGCATCAAACAT  
 AF543829.1 TTTAGGTCATTCCATGAACGCCAAAATGTGCATAATCGAGTCACGCAAGGCATCAAACAT  
 \*\*\*\*\*  
 JN019813.1 GGTATCCACTCGCGCAGAACTGCTAGCACACAACAGATTCATGAAGCACAAAACCACT  
 AB010301.1 GGCTCCACTCGCGCAGACTTGCTAGCTCAACAACAGATTCATGAAGCGCCCAAACCACT  
 AF543829.1 GGCTCCACCCGCGCAGACTTGCTAGCACACAACAAATTCACGAAGCGCCGAAACCACT  
 \*\*\*\*\*  
 JN019813.1 CATGCTTACATTTTAGAAATCCTTGACCCAGAAATGCATCCTTACGACTTCAACTTCTTA  
 AB010301.1 CATGCTTACATTTTAGAAATCCTTGACCCAGAAATGCATACCTACGATTTCAACTTCTTA  
 AF543829.1 CATGCTTACATTTTAGAAATCCTTGACTCCGAAATGCATCCTTACGATTTCAACTTCTTA  
 \*\*\*\*\*  
 JN019813.1 GCCTGTCTACAATTTGCTCAACCCAACCTCCCAAGCGATATTAGAATAATATATATATGTA  
 AB010301.1 GCCTGTTTACAATTTGCTCAACCCAACCTCCCAAGCGATGTTAGAATTAGTATATATATG  
 AF543829.1 GCCTGTTTACAATTTGCTCAACCCAATCTCCCAAGCGATATTAGAATAATATATATATA  
 \*\*\*\*\*  
 JN019813.1 TTATCTTCCGTAAGTAGGAAACTAGGTCGTAAATCCAACAGAATAAACCCCTTACTGGG  
 AB010301.1 TTATCCTCTGCTAGTAGGAAAATAGGTCGTAAATCCAACAGAATAAACCCCTTACTGGG  
 AF543829.1 TTATCTTCTGCAAGTAGGAAAGCTAGGTCGTAAATCCAACAGAATAAACCCCTTACTGGG  
 \*\*\*\*\*  
 JN019813.1 ACGTCGAAATGTGCAGCTCGCCGTAGAGCAAAACGCTACAACCGATGTTTTGACTGCGGC  
 AB010301.1 ACGTCGAAATGTGCAGCCCGCCGTAGAGCAAAACGCTATAACCGGTGTTTTGATTGCGGT  
 AF543829.1 ACGTCGAAGTGCGCAGCTCGCCGTAGAGCAAAACGCTATAACCGGTGTTTTGACTGCGGC  
 \*\*\*\*\*  
 JN019813.1 GCCTCGCTGAACACTGACCACGTATGTAAATTATTCACAAGTCGAGCCAGTACAGACTGC  
 AB010301.1 GCCTTGCTGAACACTGACCACGTATGTAAATTATTCACAAGTCGAGCCAGTACAGACTGC  
 AF543829.1 GCCTTGCTGAACACCGACCACGTATGTAAATTATTCACAAGTCGAGCCAGTACAGACTGC  
 \*\*\*\*\*  
 JN019813.1 TTACATGTCATTCATGAAGACCCGCTAAG  
 AB010301.1 TTACACGTCATTCGTGAAGACCCGCTAAG  
 AF543829.1 TTACATGTCATTCATGAAGACCCGCTAAG  
 \*\*\*\*\*

## APÊNDICE 4

Alinhamento da região **parcial** codificadora para a proteína capsidial de espécies de GarV-X, e localização dos quatro oligonucleotídeos desenhados. Em azul escuro o CPXS1, em amarelo CPXS2, em vermelho o CPXA1, em verde o CPXA2. HQ873822, GQ475426, HQ873851, AJ292229, U89243 e NC\_001800: GarV-X

```
HQ873822 ATGGGCGATCGGAACCAAGGAATAAATCCCAACCAGGGACTCAATGCCCAAGCGCAAGGT
GQ475426 ATGGGCGATCGGAACCAAGGAATAAATCCCAACCAGGGACTCAATGCCCAAGCGCAAGGT
HQ873851 ATGGGCGATCGGAACCAAGGAATAAATCCCAACCAGGGACTCAATGCCCAAGCGCAAGGT
AJ292229 ATGGGCGATCGGAACCAAGGAATAAATCCCAACCAGGGACTCAATGCCCAAGCGCAAGGT
U89243 ATGGGCGATCGGAACCAAGGAATAAATCCCAATCAGGGACTCAACGCTCAAGTGAAGGC
NC_001800 ATGGGCGATCGGAACCAAGGAATAAATCCCAATCAGGGACTCAACGCTCAAGTGAAGGC
*****
```

```
HQ873822 GATGGAACAAGCAATCAAAGTCAACGCCCTAATAGGAATCCAACCTCTCGACCCCAAGCT
GQ475426 GATGGAACAAGCAATCAAAGTCAACGCCCTAATAGGAATCCAACCTCTCGACCCCAAGCT
HQ873851 GATGGAACAAGCAATCAAAGTCAACGCCCTAATAGGAATCCAACCTCTCGACCCCAAGCT
AJ292229 GATGGAACAAGCAATCAAATCAACGCCCAATAGGAATCCACCTCTCGACCCCAAGCT
U89243 GATGGAGCAAGCAATCAGAATCAACGCCCAACAGGAATCCACCTCTCGACCCCTCGCT
NC_001800 GATGGAGCAAGCAATCAGAATCAACGCCCAACAGGAATCCACCTCTCGACCCCTCGCT
***** CAAGCAATCAGAATCAAG *****
```

```
HQ873822 GACTTAAACGCCCAGAACAATGTCATGCCTTCTGAAAATGACTTAGCAGCGATAGCAAGT
GQ475426 GACTTAAACGCCCAGAACAATGTCATGCCTTCTGAAAATGACTTAGCAGCGATAGCAAGT
HQ873851 GACTTAAACGCCCAGAACAATGTCATGCCTTCTGAAAATGACTTAGCAGCGATAGCAAGT
AJ292229 GACTTAAACGCCCAGAACAATGTCATGCCTTCTGAAAATGACTTAGCAGCGATAGCAAGT
U89243 GACTCAAATGCCCAGAACTCTATAATGCCTTCTGAAAATGACTTAGCAGCGATAGCAAGT
NC_001800 GACTCAAATGCCCAGAACTCTATAATGCCTTCTGAAAATGACTTAGCAGCGATAGCAAGT
***** GCCTTCTGAAAATGACTTAG *****
```

```
HQ873822 GATGTAACCTCCAACCTCAGTAGCCACACAGGAACTATCCGCGAAATCCTCAGTACCCTT
GQ475426 GATGTAACCTCCAACCTCAGTAGCCACACAGGAACTATCCGCGAAATCCTCAGTACCCTT
HQ873851 GATGTAACCTCCGACTCAGTAGCCACACAGGAACTATCCGCGAAATCCTCAGTACCCTT
AJ292229 GATGTAATTTCAAACCTCAGTAGCCACACAGGAGACTATCCGTGAAATCCTCAGCACCTT
U89243 GACGTAACCTCCAATTCAGTAGCCACACAGGAGACTATCCGGGAAATCCTCAGCACCTT
NC_001800 GACGTAACCTCCAATTCAGTAGCCACACAGGAGACTATCCGGGAAATCCTCAGCACCTT
*****
```

```
HQ873822 CAAGCAAGGCGACCCAATGCGACACCCAAAGACTTATTTTCGCTTGCATGGGCATGCTAC
GQ475426 CAAGCAAGGCGACCCAATGCGACACCCAAAGACTTATTTTCGCTTGCATGGGCATGCTAC
HQ873851 CAAGCAAGGCGACCCAATGCGACACCCAAAGACTTATTTTCGCTTGCATGGGCATGCTAC
AJ292229 CAAGCAAGGCGACCCAATGCAACCCCAAGACTTATTTTCGCTTGCATGGGCATGCTAC
U89243 CAAGCGAGCGGGCCCGCTGCAACACCCAAAGACTTGTTCCTTGCATGGGCATGCTAC
NC_001800 CAAGCGAGCGGGCCCGCTGCAACACCCAAAGACTTGTTCCTTGCATGGGCATGCTAC
*****
```

```
HQ873822 CACAATGGATCATCAGATTACGACAATGACTACTGACGCCCCCTTGCGGCATGCCTCAC
GQ475426 CACAATGGATCATCAGATTACGACAATGACTACTGACGCCCCCTTGCGGCATGCCTCAC
HQ873851 CACAATGGATCATCAGATTACGACAATGACTACTGACGCCCCCTTGCGGCATGCCTCAC
AJ292229 CACAACGGATCATCAGATTACACAATAATGACCACTGACGCACCTTGTGGCATGCCTCAC
U89243 CACAATGGATCATCAGATTACGACAATGACCACTGACGCACCTTGTGGCATGCCTCAC
NC_001800 CACAATGGATCATCAGATTACGACAATGACCACTGACGCACCTTGTGGCATGCCTCAC
*****
```

```
HQ873822 GCGGAGCTCAAAGACCTCGTTGAAGATTACTGTACGCTGAGACAATTTTGTGGTTACTAC
GQ475426 GCGGAGCTCAAAGACCTCGTTGAAGATTACTGTACGCTGAGACAATTTTGTGGTTACTAC
HQ873851 GCGGAGCTCAAAGACCCCGTTGAAGATTACTGTACGCTGAGACAATTTTGTGGTTACTAC
AJ292229 GCGGAGCTCAAAGACCTCGTTGAAGATTACTGCACGCTGAGACAATTTTGTGGTTACTAC
U89243 GCAGAGCTCAAAGACCTCGTTGAAGATTACTGCACGCTGAGACAATTTTGTGGTTACTAC
NC_001800 GCAGAGCTCAAAGACCTCGTTGAAGATTACTGCACGCTGAGACAATTTTGTGGTTACTAC
*****
```

HQ873822 GCCAAAACATGCTACGTACCGGGGAAAGCAGCAAAATAAGCCACCAGCCAACCTGGTCTCGA  
 GQ475426 GCCAAAACATGCTACGTACCGGGGAAAGCAGCAAAATAAGCCACCAGCCAACCTGGTCTCGA  
 HQ873851 GCCAAAACATGCTACGTACCGGGGAAAGCAGCAAAATAAGCCACCAGCCAACCTGGTCTCGA  
 AJ292229 GCCAAAACATGCTATGTACGGGGAAAGCAGCAAAATAAGCCAGCCAACCTGGTCTCGA  
 U89243 GCCAAAACATGCTATGTACGGGGAAAGCAGCAAAATAAGCCACCAGCCAACCTGGTCTCGA  
 NC\_001800 GCCAAAACATGCTATGTACGGGGAAAGCAGCAAAATAAGCCACCAGCCAACCTGGTCTCGA  
 \*\*\*\*\*

HQ873822 AAAGGTTTCCAAGATGAGTCAAAATTCGCTGCCTTTGATTTCTTCAATGCTGTAATGAGC  
 GQ475426 AAAGGTTTCCAAGATGAGTCAAAATTCGCTGCCTTTGATTTCTTCAATGCTGTAATGAGC  
 HQ873851 AAAGGTTTCCAAGATGAGTCAAAATTCGCTGCCTTTGATTTCTTCAATGCTGTAATGAGC  
 AJ292229 AAAGGTTTCCAAGAGGAATCAAAATTTGCTGCCTTTGATTTCTTCAACGCTGTGATGAGC  
 U89243 AAAGGTTTCCAAGAGGAATCAAAATTTGCCGCTTTGATTTCTTCAACGCCGTAATGAGC  
 NC\_001800 AAAGGTTTCCAAGAGGAATCAAAATTTGCCGCTTTGATTTCTTCAACGCCGTAATGAGC  
 \*\*\*\*\*

HQ873822 GATTCGTCTCCAACACCACCTGGTGGTATGCGATTTAAACCAACACATGAGGAGATTGTG  
 GQ475426 GATTCGTCTCCAACACCACCTGGTGGTATGCGATTTAAACCAACACATGAGGAGATTGTG  
 HQ873851 GATTCGTCTCCGACACCACCTGGTGGTATGCGATTTAAACCAACACATGAGGAGATTGTG  
 AJ292229 GACTCGTCCCCAACACCACCTGGCGGCATGCGGTTCAAACCAACACATGAGGAGATTGTG  
 U89243 GACTCGTCTCCACACCACCTGGTGGTATGCGATTTAAACCAACCCATGAGGAGATTGTG  
 NC\_001800 GACTCGTCTCCACACCACCTGGTGGTATGCGATTTAAACCAACCCATGAGGAGATTGTG  
 \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

HQ873822 GGACACTCCATGAATGCGAAGATGTCCATCATTGAGTCGCGTAAAGCCTCGAATATGGTT  
 GQ475426 GGACACTCCATGAATGCGAAGATGTCCATCATTGAGTCGCGTAAAGCCTCGAATATGGTT  
 HQ873851 GGACACTCCATGAATGCGAAGATGTCCATCATTGAGTCGCGTAAAGCCTCGAATATGGTT  
 AJ292229 GGACACTCCATGAACGCGAAGATGTCCATCATTGAGTCGCGTAAAGCATCAAATATGGTT  
 U89243 GGACACTCCATGAACGCAAAGATGTCCATTATCGAGTCACCGAAAGCCTCGAATATGGTT  
 NC\_001800 GGA**CACTCCATGAACGCAAAG**ATGTCCATTATCGAGTCACCGAAAGCCTCGAATATGGTT  
 \*\*\*\*\*

HQ873822 TCCACTCGCGTGATCTGTTGGCCCAACAGCAAATCCATGAAGCTCCGAAACCCCTTATG  
 GQ475426 TCCACTCGCGTGATCTGTTGGCCCAACAGCAAATCCATGAAGCTCCGAAACCCCTTATG  
 HQ873851 TCCACTCGCGTGATCTGTTGGCCCAACAGCAAATCCATGAAGCTCCGAAACCCCTTATG  
 AJ292229 TCGACTCGCGTGATCTGTTGGCCAGCAGCAAATCCATGAAACCCCAAAACCCCTCATG  
 U89243 TCCACTCGAGCCGACTCGTTGGCCCAACAGCAAATCCATGAAGCTCCAAACCCCTTATG  
 NC\_001800 TCCACTCGAGCCGACTCGTTGG**CCCAACAGCAAATCCATG**AAGCTCCAAACCCCTTATG  
 \*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*

HQ873822 CTCACATTCTGA-----  
 GQ475426 CTCACATTCTGA-----  
 HQ873851 CTCACATTCTGA-----  
 AJ292229 CTCACATTCTAAATCAAATAAATGCATCGCTACGA  
 U89243 CTCACATTCTGAATCAAATAAATGCATAGTTACGA  
 NC\_001800 CTCACATTCTGAATCAAATAAATGCATAGTTACGA  
 \*\*\*\*\* \*