

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**VIROSES DO ALHO: MÉTODOS DE DIAGNOSE E
DEGENERESCÊNCIA DO ALHO SEMENTE LIVRE DE VÍRUS**

TATIANA MITUTI

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU- SP

Novembro – 2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**VIROSES DO ALHO: MÉTODOS DE DIAGNOSE E
DEGENERESCÊNCIA DO ALHO SEMENTE LIVRE DE VÍRUS**

TATIANA MITUTI

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan
Co-orientadora: Prof. Dra. Renate Krause Sakate

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU- SP

Novembro – 2013

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

M685v Mituti, Tatiana, 1984-
Viroses do alho: métodos de diagnose e degenerescência
do alho semente livre de vírus / Tatiana Mituti. - Botucatu:
[s.n.], 2013
ix, 85 f. : ils. color., grafs., tabs., fots. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Fa-
culdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2013
Orientador: Marcelo Agenor Pavan
Coorientador: Renate Krause Sakate
Inclui bibliografia

1. Alho - Cultivo. 2. Alho - Doenças e pragas. 3. Alho -
Sementes. 4. Vírus de plantas. 5. Termoterapia. I. Pavan,
Marcelo Agenor. II. Sakate, Renate Krause. III. Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botu-
catu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “VIROSES DO ALHO: MÉTODOS DE DIAGNOSE E
DEGENERESCÊNCIA DO ALHO SEMENTE LIVRE DE VÍRUS”

ALUNA: TATIANA MITUTI

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN

COORIENTADORA: PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE

Aprovado pela Comissão Examinadora



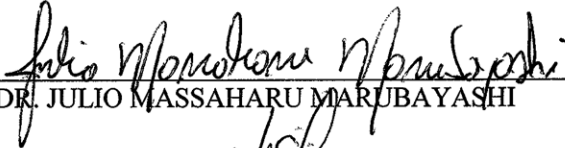
PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN



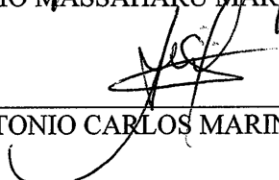
PROF. DR. MARCIO MARTINELLO SANCHES



PROF. DR. VALDIR ATSUSHI YUKI



PROF. DR. JULIO MASSAHARU MARUBAYASHI



PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI

Data da realização 18 de novembro de 2013.

AGRADEÇO

A Deus e a todos que me incentivaram e colaboraram durante todas as etapas.

DEDICO

Aos meus pais Luiz e Felicia, a minha irmã Elaine, ao meu pequeno fofuchinho Nicolas e ao meu noivo Ricardo Kiyoto.

*"Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas
no teatro da vida e entender que não existem pessoas
de sucesso e pessoas fracassadas.*

O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles."

(Augusto Cury)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Marcelo Agenor Pavan pela orientação, amizade, pelos ensinamentos, principalmente na parte de campo, que contribuíram para o meu crescimento profissional e por ter proporcionado as melhores condições para realização deste trabalho.

À Professora Renate Krause Sakate pela paciência, sugestões durante os trabalhos desenvolvidos, pelos conselhos e por todo conhecimento que adquiri ao longo do curso.

À UNESP/FCA pela oportunidade e apoio para o desenvolvimento do trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e CAPES/PDSE pela concessão da bolsa no Brasil e no Exterior.

À minha família por todo o apoio e carinho durante todas as etapas da minha vida, com certeza sem eles não teria conseguido chegar até aqui, em especial, ao meu sobrinho Nicolas, por ter me dado mais inspiração a cada dia.

Ao meu noivo Ricardo Kiyoto Hirai pelo amor e carinho durante todo esse tempo, pela compreensão e paciência nas horas em que estive ausente, e principalmente durante o tempo de estágio no Japão, que me ajudou e esteve ao meu lado em todos os momentos.

Ao Dr. Kazuo Yamashita do Instituto Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center, pela orientação durante o estágio no Japão, pela receptividade e pela paciência devido à dificuldade de comunicação no início. Ao pessoal do Instituto que me receberam com muito carinho: Dr. Yokoyama, chefe do departamento que sempre esteve preocupado com a minha estadia no Japão, Niwata Sensei por ter me ensinado toda técnica de cultura de meristema, Kogawa san pelas tequilas durante a festa

de despedida, Shindo san, Naito san, Kitano san, Sahori san e Fujii san pela companhia diária, Ito san e Yoshida san pela convivência no laboratório e pelas conversas que me auxiliaram na prática da língua japonesa. みなさまのことさみしくおもっています、どうもありがとうございました！

Ao Prof. Dr. Teruo Sano da Universidade de Hirosaki por ter me recebido, por ter me auxiliado na elaboração do projeto e pelo preparo de todas as documentações para realização do meu estágio no exterior.

Ao Dr. Álvaro Almeida por toda contribuição ao longo da minha vida acadêmica, por sempre me incentivar e apoiar para chegar ao final de mais uma etapa.

Ao Dr. Kaoru Hanada do Instituto de Pesquisa de Tsukuba (National Agricultural Research Center) por ter me indicado ao Dr. Kazuo Yamashita, que possibilitou a minha ida ao Japão.

Ao professor Antonio Carlos Maringoni pelos ensinamentos e pela disposição em ajudar quando precisei.

Aos professores Edson Furtado, Edson Baldin, Carlos Gilberto Raetano, Ivan Godoy Maia, Julio Nakagawa, Romy Goto, Silvia Renata S. Wilcken, Norberto da Silva e Dr. Valdir Yuki (IAC-Campinas) que contribuíram para a minha formação ao longo do curso.

Aos colegas do Laboratório de Virologia que fizeram as horas de trabalho mais agradáveis: Cristiane Melo, Daiana Bampi, Evelyne Urzedo, Gerson Suzuki, Kessia Pantoja, Leticia Moraes, Leysimar Pitzr, Milena Leite; aos estagiários Isabel Hoffmann e Luis Fernando Watanabe. Ao meu ex-estagiário Vitor Imaizumi que me ajudou até altas horas pra finalizar os trabalhos. Ao João Paulo Nardini pela ajuda nos experimentos de campo. Aos meus parceiros de sempre Bruno De Marchi, David Spadotti e Leonardo Barbosa. Aos meus queridos amigos e companheiros de todos os momentos Mônica Fecury e Júlio Marubayashi. Muito obrigada pela companhia e pelo cafezinho de todos os dias!

Aos colegas do departamento Maysa, Ronaldo, Julio, Djanira, Denise e Juan pela convivência diária, e em especial aos meninos da Bacteriologia: Marcelo, Ricardo e Tadeu pelos momentos de gargalhadas durante os intervalos de trabalho.

Aos meus amigos irmãos Eder, Shigue, Beto, Miroka e Ju que não me abandonam nunca, estão sempre ao meu lado dando conselhos, agradeço pelos momentos de gargalhada, pelo apoio nos momentos de dificuldade e pelos momentos de descontração.

Aos meus queridos amigos da graduação: Amanda, Marcele, Hellen, Neto e Emilene pela parceria de sempre.

Aos funcionários do departamento: Norberto, Sr. Domingos e Paulinho pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Aos Engenheiros Agrônomos Isao Imaizumi e Mauro Uyeno, pelo auxílio na condução dos experimentos em Guarapuava/PR e Santa Juliana/MG, e aos demais do Grupo Genove: Milton Osamu Kamitsuji, Satoshi Kitajima, Guilherme Shimiti Koyama e Henrique Masakatsu Sakamoto pela recepção e apoio durante as coletas em campo.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
1. RESUMO.....	01
2. SUMMARY.....	03
3. INTRODUÇÃO.....	05
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	07
4.1. A cultura do alho e sua produção.....	07
4.2. Viroses do alho.....	09
4.2.1. Gênero <i>Allexivirus</i>	09
4.2.2. Gênero <i>Carlavirus</i>	10
4.2.3. Gênero <i>Potyvirus</i>	12
4.3. Transmissão.....	14
4.4. Métodos para identificação e detecção de vírus em alho.....	14
4.5. Controle de viroses em alho.....	15
5. REFERÊNCIAS.....	17
 CAPÍTULO 01	
Estudo da degenerescência do alho-semente livre de vírus durante três anos consecutivos.....	23
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	25
INTRODUÇÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	32
 CAPÍTULO 2	
Análise de vírus em bulbilhos aéreos de alho provenientes dos escapes florais.....	35
RESUMO.....	36
ABSTRACT.....	37
1. INTRODUÇÃO.....	38
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4. REFERÊNCIAS.....	45
 CAPÍTULO 3	
Concentração de <i>Potyvirus</i> durante diferentes estágios de desenvolvimento do alho (<i>Allium sativum</i> L.).....	48
RESUMO.....	49
ABSTRACT.....	50
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	51

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4. REFERÊNCIAS	54

CAPÍTULO 4

Detection of <i>Leek yellow stripe virus</i> in garlic: sensitivity of different techniques and methods of sample preparations.....	55
ABSTRACT	56
RESUMO	57
1. INTRODUCTION	58
2. MATERIALS AND METHODS	58
2.1. Primer design.....	58
2.2. Samples preparation.....	59
2.2.1 Virus purification.....	59
2.2.2. Crude sap and total RNA extraction.....	59
2.3. Real time RT-PCR.....	59
2.4. Dot Immunobinding Assay (DIBA) using chemiluminescent protein detection...	60
2.5. DIBA using colorimetric protein detection.....	60
2.6. Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)	60
2.7. Dilutions of samples.....	61
3. RESULTS	61
3.1. Selection of real time RT-PCR primers and buffers for nucleic acids preparation.....	61
3.2. Comparison of ELISA, DIBA and Real Time RT-PCR using purified virus.....	62
3.3. Comparison of ELISA, DIBA and Real time RT-PCR using crude sap.....	64
4. DISCUSSION	66
5. REFERENCES	68

CAPÍTULO 5

Distribution and concentration of <i>Leek yellow stripe virus</i> on garlic leaves in different stages of development.....	70
ABSTRACT	71
RESUMO	72
1. INTRODUCTION	73
2. MATERIAL AND METHODS	74
2.1. Inoculation of plants and sample preparation.....	74
2.2. Techniques of analysis.....	75
2.2.1. Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	75
2.2.2. Dot Immunobinding Assay (DIBA) using chemiluminescent and colorimetric protein detection.....	76
2.2.3. Real Time RT-PCR.....	76
3. RESULTS AND DISCUSSION	77
4. REFERENCES	82
CONCLUSÕES GERAIS	85

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO 1

Quadro 1 – Oligonucleotídeos utilizados para detecção dos gêneros *Carlavirus*, *Potyvirus* e *Allexivirus*..... 27

Quadro 2 – Condução do ensaio em campo para estudo de degenerescência do alho livre de vírus..... 29

Tabela 1 – Número de plantas analisadas para a presença dos gênero *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus*, durante os períodos de 2011 a 2013..... 31

Tabela 2 – Peso médio de cada bulbo (gramas) referente aos 2 tratamentos realizados nos anos de 2011 a 2013..... 31

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para detecção dos gêneros *Allexivirus*, *Carlavirus* e *Potyvirus*..... 40

Tabela 2 – Análise para a presença de *Potyvirus*, *Allexivirus* e *Carlavirus* em plantas de alho (matriz) coletadas em 2011 e plantas provenientes de bulbilhos aéreos (geração 1), obtidos das matrizes..... 43

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Desenvolvimento da cultura do alho..... 52

CAPÍTULO 4

Table 1 – Dilutions with crude sap used for Real Time RT-PCR, and the estimated concentration of each sample, based in Purified LYSV-RNA dilutions used as standard curve..... 66

CAPÍTULO 5

Table 1 – Results from colorimetric and chemiluminescent DIBA test with 14 and 21 days after inoculation..... 79

Table 2 – Virus concentration in garlic leaves using crude sap and total RNA. The collection date and number of copies of the virus per microliter was estimated using the formula: $\text{Copy}/\mu\text{L} = (A/B) \times C$. A=Concentration (ng); B=330 x length of fragment (bp); $C = 6,02 \times 10^{14}$ 81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização do genoma da espécie <i>Shallot virus X</i> , membro tipo do genero <i>Allexivirus</i> . As ORFs estão demonstradas pelos retângulos, e as proteínas traduzidas, pelas linhas sólidas, com suas respectivas massas moleculares (kDa) (KING et al., 2012).....	10
Figura 2 – Organização genômica de carlavirus. As ORFs estão demonstradas pelos retângulos, e as proteínas traduzidas, pelas linhas sólidas, com suas respectivas massas moleculares (kDa) (KING et al., 2012).....	11
Figura 3 – Organização do genoma da espécie <i>Tobacco etch virus</i> , membro do gênero <i>Potyvirus</i> .As ORFs estão demonstradas pelos retângulos, e as proteínas traduzidas, pelas linhas sólidas, com suas respectivas massas moleculares (kDa) (KING et al., 2012).....	13
 CAPÍTULO 2	
Figura 1 – (A) Escape floral; (B) Bulbilho aéreo com um único dente obtido no primeiro ano; (C) Formação do bulbo completo após o segundo ano.....	41
 CAPÍTULO 3	
Figura 1 – Média da concentração viral dos dois tratamentos com relação à época de coleta.....	52
 CAPÍTULO 4	
Figure 1 – Dissociation curve (melt) realized for LYSV.....	62
Figure 2 – (A) DIBA test; (B) Chemiluminescent test. Both of tests were used purified virus in a dilution of 10µg/mL to 1 ng/mL.....	62
Figure 3 – (A) ELISA test with purified virus in a dilution of 10µg/mL to 1 ng/mL. (VF= virus free garlic leave used as negative control). (B) Real time RT-PCR with dilutions of purified virus in a dilution of 10µg/mL to 1 ng/mL.....	63
Figure 4 – (A) Colorimetric DIBA test; (B) Chemiluminescent DIBA test. Both of tests were used crude sap in a dilution of 10x to 10.000x.....	64
Figure 5 – (A) ELISA test with crude sap in a dilution of 10x to 10,000x (OYDV= <i>Onion yellow dwarf virus</i> and VF= virus free garlic leave used as negative control). (B) Real Time RT-PCR with crude sap, with the dilutions of 10x to 500.000x.....	65
 CAPÍTULO 5	
Figure 1 – Parts of garlic leaves analyzed, divided into three parts (tip, middle and base); and number of each leaf analyzed.....	73
Figure 2 – Detection of LYSV in garlic plants by ELISA test. Absorbance measured at 405nm.....	76
Figure 3 – Concentration of LYSV in garlic plants, analyzed by Real Time RT-PCR with crude sap (A); and with total RNA (B).	78

1. RESUMO

Espécies de vírus dos gêneros *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus* são comumente encontradas na cultura do alho (*Allium sativum* L.) e em decorrência da sua propagação vegetativa, há o acúmulo de vírus de um ciclo para outro, formando um complexo entre espécies dos gêneros citados. Uma das principais causas da redução da produtividade ocorre devido à infecção por vírus, e a termoterapia associada à cultura de tecido pode ser um método eficiente para limpeza clonal e obtenção de alho semente livre de vírus. O estudo da degenerescência do alho livre de vírus é, portanto, importante para se conhecer o número de ciclos em que o alho semente, inicialmente sadio, pode ser multiplicado no campo, sem que ocorra a redução da produtividade. Neste estudo foi verificado que após três anos a produtividade foi 13,75% superior ao alho 100% infectado por vírus. Os bulbilhos aéreos também podem ser utilizados para a multiplicação de sementes e tem como vantagem o baixo custo quando comparado à utilização de bulbos provenientes da cultura de tecido. Entretanto, essa técnica só se torna viável com a utilização de matrizes isentas de vírus, pois a transmissão de vírus para os bulbilhos aéreos, provenientes de matrizes infectadas, podem chegar a 83,33% no caso dos potyvirus, 20% para carlavirus e 70% para allexivirus, segundo dados obtidos neste trabalho. Realizar uma diagnose precisa dos vírus que infectam o alho torna-se essencial para que não ocorram falhas durante a indexação. Pôde-se observar que para a detecção dos potyvirus, utilizando o teste de ELISA indireto, deve-se utilizar folhas novas, entre 21 e 63 dias após o plantio, pois a concentração viral nesse período é a mais elevada. Diferentes técnicas como o DIBA colorimétrico, DIBA quimioluminescente, ELISA e PCR em tempo real foram avaliadas para detecção do LYSV, aos 21 dias após a inoculação das plantas. O teste de ELISA

detectou o LYSV somente aos 21 dias após inoculação, enquanto a PCR em tempo real, aos 5 dias após inoculação, detectou o vírus, devido a sua elevada sensibilidade. Os demais testes também detectaram o LYSV aos 21 dias após infecção.

Palavras-chaves: potyvirus; carlavirus; allexivirus; concentração viral.

GARLIC VIRUSES: METHODS OF DIAGNOSIS, DAMAGE AND DEGENERATION OF GARLIC VIRUS-FREE

Botucatu, 2013. Thesis (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agronômicas, Câmpus de Botucatu.

Author: Tatiana Mituti

Adviser: Marcelo Agenor Pavan

Co-Adviser: Renate Krause Sakate

2. SUMMARY

Virus species of genera *Potyvirus*, *Carlavirus* and *Allexivirus* are commonly infecting garlic plants (*Allium sativum* L.). Due to the vegetative propagation, the accumulation of viruses might occur from one cycle to another. The infection of viruses might induce yield losses, and the technique of thermotherapy associated with meristem tip culture is an efficient method to obtain virus-free seeds. The study of degeneration of seeds free of virus is important to know the number of cycles in which garlic may be multiplied in the field without reduction of productivity. In this study it was observed that after three years, the productivity increased 13,75% compared to 100% infected seeds. Currently, aerial bulbils may be used for multiplication of seeds with low cost, compared to meristem tip culture. However, this is a viable technique only if the matrix is free of viruses, because the transmission to aerial bulbils, from infected plants can reach 83.33 % for potyviruses, 20% for carlavirus and 65% for allexivirus, data obtained in this work. An accurate diagnosis in viruses that infect garlic is important to avoid mistakes during indexing material. It was

observed that the best time to detect potyvirus, through ELISA test is between 21 and 63 days after planting on young leaves, as the virus concentration is higher in this period. When using different techniques, such as the colorimetric DIBA, chemiluminescent DIBA, ELISA, and real-time PCR, it was possible to perform the detection of LYSV 21 days after inoculation. ELISA test detected LYSV only at 21 days after inoculation, whereas using real time PCR, in 5 days after inoculation it was possible to detect the virus due to its high sensitivity. The other tests also detected the virus 21 days after infection.

Keywords: *Potyvirus*; *Carlavirus*; *Allexivirus*; Viral concentration.

3. INTRODUÇÃO

A cultura do alho favorece a ocorrência do complexo viral devido a sua forma de propagação vegetativa (FAJARDO et al., 2001). No Brasil há dez espécies virais descritas em alho, sendo duas do gênero *Potyvirus*: *Leek yellow stripe virus* (LYSV) e *Onion yellow dwarf virus* (OYDV); duas do gênero *Carlavirus*: *Garlic common latent virus* (GarCLV) e *Shallot latent virus* (SLV) e o gênero *Allexivirus* conta com seis espécies: *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV), *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B), *Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D) e *Garlic virus X* (GarV-X) (DUSI, et al., 1994; MELO FILHO et al., 2004; MITUTI et al., 2011; OLIVEIRA, 2013).

Os sintomas típicos observados nas folhas de alho são estrias de cor verde claro ou amarela, conhecidas como “mosaico do alho” e os vírus geralmente não ocasionam morte das plantas e convivem com o alho de forma crônica, perpetuando-se através de distintos ciclos de cultivo, ajudado pela natureza agâmica da espécie (PAVAN, 1998).

A infecção mista entre duas ou mais espécies de diferentes gêneros pode ocasionar até 78% de redução da produção. A termoterapia associada à cultura de meristema é um método eficaz, utilizado para a produção de sementes livres de vírus.

O alho livre de vírus em condições de campo está sujeito a re-infecção viral. Para determinar por quantas gerações o alho inicialmente sadio se mantém mais produtivo quando comparado ao alho infectado por vírus, foi realizado um estudo de degenerescência do alho. Estes dados são apresentados no Capítulo 1.

Outra forma alternativa de produção de alho livre de vírus é o aproveitamento dos bulbilhos aéreos provenientes dos escapes florais a partir de plantas sadias (EBI et al., 2000). O baixo custo e a rapidez para formação do bulbo, que já ocorre após o segundo ano de cultivo (MATHEW, 2007; POSPISIL, 2010) tornam a técnica bastante atrativa. No segundo capítulo foi analisada se os vírus são perpetuados através dos bulbilhos aéreos e qual a porcentagem de perpetuação. Os resultados estão descritos no capítulo 2.

Até o momento, pouco se sabe sobre o movimento e distribuição dos vírus em plantas de alho recém-infectadas. Diagnósticos mais precisos podem ser realizados se a coleta do tecido vegetal contiver maior concentração viral (CONCI et al., 2010). Estudos realizados com OYDV e LYSV indicam que a concentração viral em diferentes partes da folha pode variar, dependendo do vírus (CONCI et al., 2010). Como no Brasil o clima tropical propicia um menor ciclo de cultivo do alho (em geral 180 dias) comparado aos 230 dias em países como Argentina e Japão, realizou-se um experimento para verificar a distribuição de vírus pelas diferentes folhas do alho ao longo do ciclo da cultura. Estes resultados estão descritos no Capítulo 3.

A espécie LYSV é considerada mundialmente a mais importante em alho, podendo ocasionar sintomas severos e redução de até 44,7% no peso dos bulbos (LOT et al., 1998). Nos capítulos 4 e 5 foram descritas diferentes técnicas para detecção do LYSV, analisando sua sensibilidade, em diferentes partes da planta de alho.

Deste modo, o presente trabalho foi dividido em 5 capítulos intitulados: 1) “Estudo da degenerescência do alho-semente livre de vírus durante três anos consecutivos” redigido em português conforme as normas da revista *Scientia Horticulturae*; 2) “Análise de vírus em bulbilhos aéreos de alho provenientes dos escapes florais” redigido em português conforme as normas da revista *Journal of Plant Pathology*; 3) “Concentração de Potyvirus durante diferentes estágios de desenvolvimento do alho (*Allium sativum* L.)” redigido conforme as normas da revista *Summa Phytopathologica*; 4) “Detection of *Leek yellow stripe virus* in garlic: sensitivity of different techniques and methods of sample preparations”, redigido em inglês conforme normas da revista *Journal of Virological Methods*; 5) “Concentration of *Leek yellow stripe virus* on garlic leaves in different stages of development” redigido em inglês conforme as normas da revista *Tropical Plant Pathology*.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. A cultura do alho e sua produção

O alho (*Allium sativum* L.) é uma planta pertencente à família Liliaceae, do gênero *Allium*. É uma espécie herbácea, que origina um bulbo, composto por bulbilhos, sendo que cada bulbilho contém uma gema capaz de originar uma nova planta após a brotação. É uma planta que se comporta como uma cultura anual, apresentando apenas a etapa vegetativa do ciclo biológico (FILGUEIRA, 2007).

O centro de origem dessa cultura são as Zonas Temperadas da Ásia Central, de onde se espalhou para a região do Mediterrâneo. Acredita-se que o alho cultivado hoje no Brasil tenha vindo do México, Egito e de alguns países da América do Sul (MENEZES SOBRINHO, 1978).

As épocas de plantio podem variar de região para região, devido à diversidade climática. Para que ocorra a formação dos bulbos, é necessário que haja interação entre fotoperíodo e temperatura, que depende da cultivar (MÜLLER e SILVA, 1983).

As temperaturas médias mensais mais indicadas para o bom desenvolvimento das plantas é de 24 °C, e para formação dos bulbos as temperaturas exigidas são de aproximadamente 13 °C, sendo que na falta dessas temperaturas não há formação dos bulbos, mesmo sob dias longos (MASCARENHAS, 1978). Na fase de amadurecimento dos bulbos, um clima seco e quente é mais favorável (FILGUEIRA, 2007).

Pesquisadores brasileiros adaptaram a técnica da vernalização pré-plantio, que consiste em manter os bulbos a uma temperatura de 3 °C a 4 °C, durante 40 a 55 dias, e os bulbos são retirados da câmara fria às vésperas do plantio, possibilitando o plantio de cultivares tardias no centro-sul do País (FILGUEIRA, 2007).

Os quatro grandes centros de produção de alho são o asiático, europeu, norte-americano e sul-americano. No centro asiático, a China destaca-se como maior produtor (77% da produção), consumidor e exportador mundial. A Argentina destaca-se como maior produtor do centro sul-americano, sendo o Brasil seu maior comprador. O volume importado em 2011 foi de 163.670 toneladas no valor de US\$ 249.366.197,00. O maior fornecedor de alho para o Brasil desde 2005 é a China, representando 61,45% do total importado. A Argentina ocupa o segundo lugar com 37,05%. No Brasil, o consumo anual, por pessoa, passou de 400 gramas para 1,4 Kg, em 2011 (LUCINI, 2012).

De acordo com dados obtidos pelo Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (2013), em 2012 o Brasil produziu 107.054 toneladas, com rendimento médio de 10.634 Kg/ha, em uma área de 10.067 hectares. Dados obtidos até o presente momento indicam uma área plantada em 2013 de 8.077 hectares, com produção de 78.606 toneladas e rendimento médio de 9.732 Kg/ha.

Na safra 2012 o Estado de Goiás foi o que mais produziu no País, com uma área de 2.392 hectares, produziu 35.303 toneladas. Em seguida veio o Estado de Santa Catarina, com produção de 19.315 toneladas, seguido de Minas Gerais, com 18.132 toneladas, e essas regiões tem um rendimento médio de 12.444 Kg/ha (Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 2013).

As cultivares plantadas são divididas em três grupos, de acordo com as regiões onde serão cultivadas. As cultivares precoces como o Branco Mineiro e Cateto Roxo têm um ciclo curto de apenas quatro meses, sem muita exigência à fotoperíodo e frio e possuem baixo valor comercial. O segundo grupo corresponde as cultivares de ciclo mediano (Lavínia e Amarante), que tem o ciclo de aproximadamente cinco meses, um pouco mais exigentes em fotoperíodo e frio, com adaptação regional mais restrita. E por fim, o grupo das cultivares tardias, que é o alho nobre, com maior valor comercial, como por exemplo, a cultivar Chonan, Roxo-Pérola-de-Caçador e Quitéria, apresentam ciclos longos, exigentes a fotoperíodo e frio, e podem ser cultivadas em regiões mais quentes como o centro-sul, aplicando-se a vernalização (FILGUEIRA, 2007).

4.4. Viroses do alho

Na cultura do alho, devido a sua propagação vegetativa, é comum a ocorrência de dois ou mais vírus de diferentes grupos taxonômicos (CONCI et al., 1992; BARG et al., 1994; TSUNEYOSHI et al., 1998; FAJARDO et al., 2001;) e esses vírus formam um complexo que causa a degenerescência do alho.

4.4.1. Gênero *Allexivirus*

Os allexivirus pertencem a Família *Alphaflexiviridae*, que engloba outros cinco gêneros: *Botrexvirus*, *Lolavirus*, *Mandarivirus*, *Potexvirus* e *Sclerodarnavirus* (KING et al., 2012). A transmissão dos vírus pertencentes a esse gênero ocorre através de ácaros da espécie *Aceria tulipae* (KANG et al., 2007).

Possuem partículas filamentosas flexuosas de 800 nm de comprimento e 12 nm de diâmetro, constituído de uma fita simples de RNA com aproximadamente 9.0 Kb e o genoma é composto de 6 ORFs (“open reading frame” ou fase aberta de leitura), e uma pequena região não traduzida na região 5’ (Figura 1). A ORF1 corresponde a polimerase, as ORFs 2 e 3 correspondem a TGB (*Triple gene block*), proteína envolvida no movimento célula-a-célula, a ORF4 não tem homologia com nenhuma outra proteína conhecida, sendo uma das características que difere um grupo do outro, e em plantas infectadas, essa proteína foi expressa em quantidades relativamente grandes e mostrou estar envolvida na montagem do vírion. A ORF5 corresponde à proteína capsidial, e a ORF6 codifica uma proteína que tem um motivo “dedo de zinco”, com capacidade para se ligar a ácidos nucleicos, e a função deste polipeptídeo ainda não é conhecido (KING et al., 2012).

Um dos critérios para demarcação de espécies envolve a análise dos genes da polimerase ou da região codificadora para a proteína capsidial. Isolados de diferentes espécies devem apresentar identidade de nucleotídeos inferior a 72% (ou 80% de identidade de aminoácidos) nestes genes. Vírus pertencentes a diferentes gêneros geralmente têm menos de 45% de identidade de nucleotídeos (KING et al., 2012).

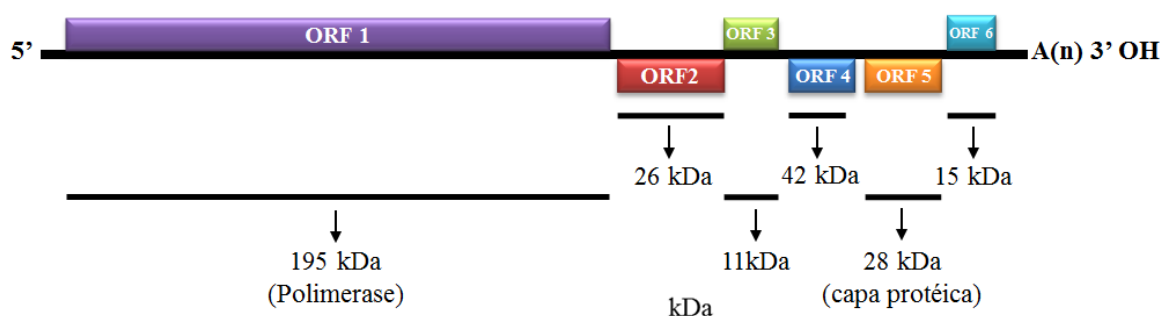


Figura 1 – Organização do genoma da espécie *Shallot virus X*, membro tipo do gênero *Allexivirus*. As ORFs estão demonstradas pelos retângulos, e as proteínas traduzidas, pelas linhas sólidas, com suas respectivas massas moleculares (kDa) (KING et al., 2012).

Estudos realizados demonstram que as espécies de allexivirus comumente infectam plantas de alho em todo o mundo (CHANG et al., 1991; HELGUERA et al, 1997; SUMI et al, 1999; MELO FILHO et al., 2004).

As espécies relatadas nesse gênero são: *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV), *Garlic virus A* (GarV-A) (SUMI et al., 1993), *Garlic virus B* (GarV-B) (SUMI et al., 1993), *Garlic virus C* (GarV-C) (SUMI et al., 1999), *Garlic virus D* (GarV-D) (SUMI et al., 1993), *Garlic virus X* (GarV-X) (SONG et al., 1997) e *Garlic virus E* (GarV-E) (CHEN et al., 2001). No Brasil há relatos das espécies GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarMbFV (MELO FILHO et al., 2004) e recentemente GarV-X (OLIVEIRA, 2013).

Estudos realizados por Cafrune e colaboradores (2006) demonstraram que o GarV-A é a espécie que mais afeta a produção, podendo levar a uma redução de 14% a 32% no peso dos bulbos, e 6% a 11% na redução do diâmetro dos bulbos.

4.4.2. Gênero *Carlavirus*

O gênero *Carlavirus* pertence à família *Betaflexiviridae*, onde engloba mais cinco outros gêneros: *Capillovirus*, *Citrivirus*, *Foveavirus*, *Trichovirus* e *Vitivirus* (KING et al., 2012).

As partículas virais são filamentosas flexuosas, tendo diâmetro de 12-15 nm, com 610 a 700 nm de comprimento, constituídos por uma molécula de RNA fita

simples (ssRNA), com tamanho de 8.3 a 8.7 kb, e poliadenilado na região terminal 3'. Algumas espécies do gênero *Carlavirus* possuem dois RNAs subgenômicos (sgRNA), com tamanho aproximado de 2 a 3 kb, e possivelmente encapsidados em partículas menores (KING et al., 2012).

O genoma é composto por 6 ORFs como demonstra a Figura 2. A ORF1 codifica uma proteína de 223 kDa correspondente a replicase, as ORFs 2, 3 e 4 formam o TGB, que corresponde a uma região conservada de genes, envolvidas no movimento do vírus célula-a-célula e a longa distância. A ORF5 corresponde à capa protéica. A ORF6 codifica uma proteína de 11-16 kDa, com função ainda não determinada, entretanto sua capacidade de se ligar a ácidos nucleicos, indica que pode auxiliar na transmissão por afídeos, ou estar envolvida na transcrição do gene do hospedeiro, silenciamento gênico ou replicação do RNA viral (ZERBINI et al., 2006; KING et al., 2012).

Para demarcação de espécies, um dos critérios utilizados é a análise dos genes da polimerase ou da proteína capsidial, onde são considerados isolados da mesma espécie quando apresentam identidade de nucleotídeos superior a 72% (ou 80% de identidade de aminoácidos). Vírus pertencentes a diferentes gêneros geralmente têm menos de 45% de identidade de nucleotídeos (KING et al., 2012).

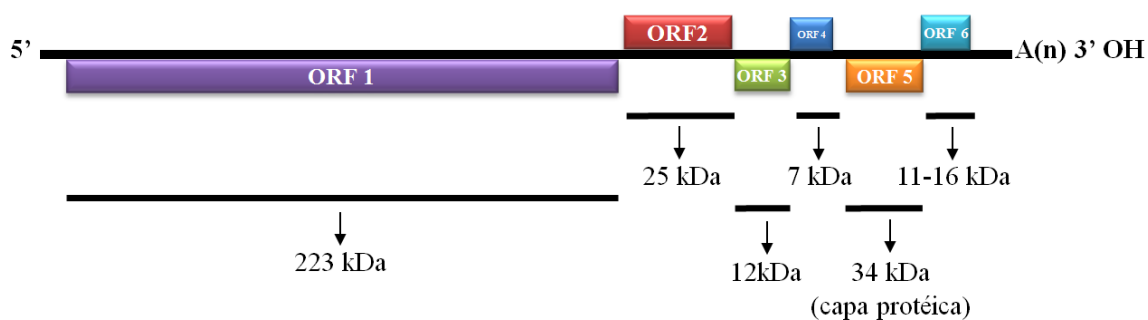


Figura 2 – Organização genômica de carlavirus. As ORFs estão demonstradas pelos retângulos, e as proteínas traduzidas, pelas linhas sólidas, com suas respectivas massas moleculares (kDa) (KING et al., 2012).

As espécies de carlavirus descritas em alho são o *Garlic common latent virus* (GarCLV) e o *Shallot latent virus* (SLV). A espécie GarCLV tem relatos na França (DELECOLLE e LOT, 1981, apud VAN DIJK, 1993), na Alemanha (GRAICHEN

e LEISTNER, 1987, apud VAN DIJK, 1993), na Holanda (VAN DIJK, 1993) e no Brasil (DANIELS, 1999; FAJARDO et al., 2001). GarCLV não é endêmico no Japão, Taiwan e na Tailândia (BARG et al., 1994).

A outra espécie ocorrente é o SLV, identificado pela primeira vez na Holanda, em plantas de chalota (*Allium cepa* var. *ascalonicum*) (BOS et al., 1978), ocasionalmente encontrados em alho-porró (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) e cebola (*Allium cepa*) na Holanda e Dinamarca (VAN DIJK, 1993). Em plantas de alho foi identificado pela primeira vez na Inglaterra (WALKEY et al., 1987), há relatos da sua ocorrência na Argentina (TORRICO e CONCI, 2010) e no Brasil (MITUTI et al., 2011).

4.4.3. Gênero *Potyvirus*

A família *Potyviridae* é contituida de seis gêneros (*Potyvirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus* e *Brambyvirus*). As partículas virais dos potyvirus são alongadas flexuosas com comprimento de 680-900 nm e com 11-13 nm de espessura. O vírion é composto por uma molécula de RNA de fita simples, senso positivo, com aproximadamente 9,7 kb de tamanho. O genoma compreende uma única ORF que codifica uma poliproteína de aproximadamente 345 kDa, e geram dez proteínas: P1-Pro, HC-Pro, P3, 6k1, CI, 6k2, NIa-VPg, Nia-Pro, NIB e CP (Figura 3) (KING et al., 2012).. Uma pequena ORF, denominada *pipo* (Pretty Interesting Potyviridae ORF), é embutida com a P3 da poliproteína e traduzida na fase de leitura +2, descoberta recentemente (CHUNG et al., 2008).

A proteína P1 desempenha um papel importante na replicação de vírus provavelmente devido à estimulação do gene supressor do silenciamento HC-Pro (Helper component-Protease), e a proteína HC-Pro é responsável pela transmissão por vetores. A P3 está envolvida no processo de replicação do vírus e desenvolvimento de sintomas, a 6K1 é uma pequena proteína com função desconhecida. As proteínas CI (Cylindrical Inclusion), que possui a função de helicase e NIB (Nuclear Inclusion b), com função de polimerase, são as principais responsáveis pela replicação viral, que ocorre no citoplasma da célula vegetal (URCUQUI-INCHIMA et al, 2001). A proteína CI forma inclusões cilíndricas denominadas “cata-vento”, características da família *Potyviridae* (MURPHY et al., 1991). A proteína NIB, forma inclusões nucleares, assim como a proteína NIa (VPg-Pro), que é a principal protease viral (URCUQUI-INCHIMA et al, 2001). A

proteína capsial (CP) auxilia no movimento dos vírus, amplificação do genoma e transmissão por vetores.

As espécies distinguem-se pelos seguintes critérios: espécies diferentes têm identidade de aminoácidos menores que 80%, e sequência de nucleotídeos menores que 76% para a CP ou genoma completo; gama de hospedeiras e reações do hospedeiro; inclusões com diferentes morfologias; relações sorológicas podem ajudar a distinguir espécies diferentes (KING et al., 2012).

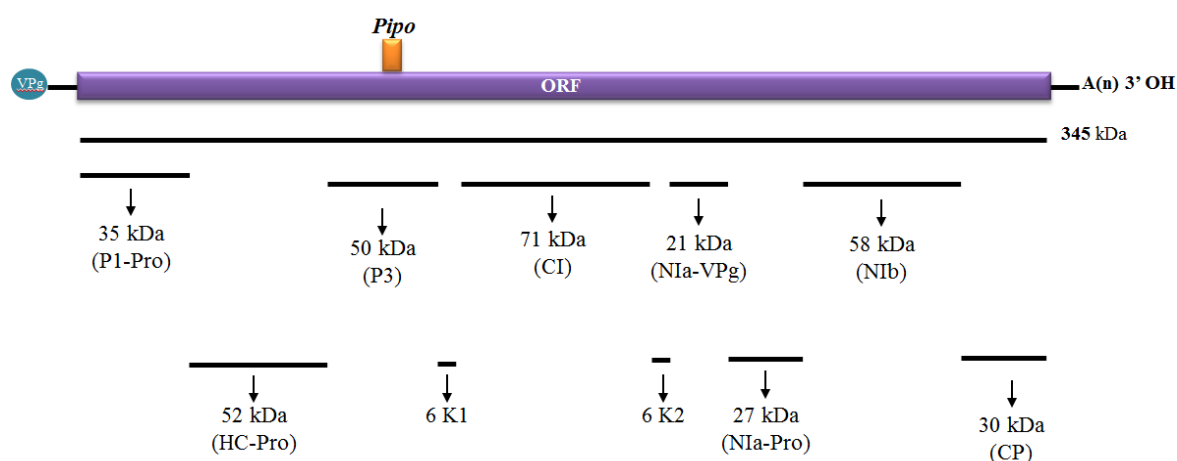


Figura 3 – Organização do genoma da espécie *Tobacco etch virus*, membro do gênero *Potyvirus*. As ORFs estão demonstradas pelos retângulos, e as proteínas traduzidas, pelas linhas sólidas, com suas respectivas massas moleculares (kDa) (KING et al., 2012).

As espécies de potyvirus mais frequentemente encontradas em alho são *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) e *Leek yellow stripe virus* (LYSV) (MAESO et al., 1997; CHEN et al., 2001; KLUKACKOVÁ et al., 2007) com relatos no sul e sudeste da Ásia (BARG et al., 1994), Itália (BELLARDI et al., 1995), Venezuela (MARYS et al., 1994), França (MESSIAEN, 1994), Japão (TAKAICHI et al., 1998) e no Brasil (DUSI, et al., 1994; DANIELS, 1999; FAJARDO et al., 2001).

LYSV pode causar sintomas de mosaico, estrias nas folhas e nanismo da planta; OYDV também pode causar nanismo, leve clorose e não apresentam estrias (BAI et al., 2010). As espécies de potyvirus são as mais frequentemente detectadas e as que têm causado mais danos em alho (SALOMON, 2002).

Quando há infecção isolada somente com a espécie OYDV, pode ocorrer perdas na produção de bulbos de até 50%, e a infecção mista de OYDV e LYSV

pode levar a redução de 78% na produção (WALKEY e ANTILL, 1989; FIDAN et al., 2009).

4.5. Transmissão

A transmissão no caso dos allexivirus ocorre através de ácaros (*Aceria tulipae*), e pode ocorrer tanto naturalmente em campo, como pode ser transmitido durante o armazenamento dos bulbos (CAFRUNE et al, 2006; KANG et al., 2007).

Os gêneros *Carlavirus* e *Potyvirus* são transmitidos por afídeos de maneira não-persistente. Testes de transmissão realizados com as espécies LYSV e OYDV indicaram nove espécies de afídeos como vetores. A espécie mais eficiente foi o *Myzus persicae*, com taxa de transmissão de 66,7% para OYDV, e 63,6% para LYSV, seguido de *Aphis craccivora*, com 60% para OYDV, e 40% para LYSV. Outras sete espécies transmitiram o vírus, porém com menor eficiência (*A. gossypii*, *Acyrtosiphon pisum*, *Dactynotus sonchi*, *Aphis nerii*, *Rhopalosiphum padi*, *Rhopalosiphum miadis*, *Schizaphis graminum*). Em todas as espécies testadas, os afídeos alados foram menos eficientes do que os afídeos ápteros na transmissão dos vírus (EL-WAHAB, 2009).

A espécie de afídeo que coloniza a cultura do alho é *Neotoxoptera formosana* (MELO FILHO et al., 2005).

4.6. Métodos para identificação e detecção de vírus em alho

Através da sintomatologia não se pode identificar qual o vírus que infecta o alho, pois a infecção por diferentes espécies induz sintomas foliares semelhantes (DUSI, 1995). Quando há formação do complexo entre mais espécies e/ou gêneros, os sintomas podem ser mais intensos, e a infecção de apenas uma espécie pode induzir sintomas mais atenuados, dependendo do gênero (TAKAICHI et al., 1998).

Métodos sorológicos e identificação biológica foram substituídos pela biologia molecular, pois os vírus que infectam a cultura do alho possuem características similares, e através dos sintomas não é possível diferenciar uma espécie da

outra. Testes sorológicos são mais precisos quando comparados com testes biológicos, entretanto o custo dos kits comerciais é elevado (BAI et al., 2010).

Os métodos moleculares, não só melhoram a especificidade de detecção e sensibilidade, mas também podem fornecer dados para a análise da sequência do genoma, importante no estudo de variabilidade dos vírus.

Para os vírus em alho existem oligonucleotídeos disponíveis na literatura, para detecção a nível de gênero (potyvirus, carlavirus e allexivirus), e também para identificação de espécies (GIBBS e MACKENZIE, 1997; TAKAICHI et al., 1998; MOTA et al, 2004; MITUTI, 2009; OLIVEIRA, 2013).

A PCR em tempo real (quantitativo) também está sendo utilizado para a detecção de vírus em alho, tendo metodologias descritas para LYSV, OYDV, SLV e GarMbFV, e de acordo com resultados obtidos, pode ser até 70% mais eficiente comparando com métodos sorológicos (LUNELLO et al., 2004; LEISOVA-SVOBODOVA et al., 2011; TASKUN et al., 2013).

4.7. Controle de viroses em alho

As plantas infectadas por vírus podem ter uma drástica redução de produtividade, e de acordo com dados obtidos por Fajardo (1998), pode haver uma queda de quase 40% quando comparadas com a produtividade de plantas livres de vírus. O peso médio dos bulbos de uma planta infectada é de 19,32 gramas, e uma planta sadia pode chegar até 44,47 gramas.

No caso dos potyvirus e carlavirus, o controle do inseto vetor não é eficiente, pois o inseto transmite o vírus em poucos segundos e a transmissão poderá ocorrer antes que o afídeo morra em decorrência da ingestão do inseticida (SATURNINO e CRUZ FILHO, 1980). Já no caso dos allexivirus, a transmissão ocorre facilmente, pois é comum encontrar ácaros nos bulbos armazenados (CAFRUNE et al, 2006), sendo recomendado a aplicação de acaricida para o armazenamento dos bulbos.

Medidas de cultivos podem ser aplicadas para controlar a incidência dos vírus. Pesquisas realizadas na China, demonstram que realizar o plantio em áreas com altitudes elevadas, 1.800 metros acima do nível do mar, pode reduzir a ocorrência da doença (BAI et al., 2010), associando medidas de práticas culturais como

evitar plantios sucessivos, evitar culturas novas próximo às velhas, realizar o controle de plantas daninhas hospedeiras de afídeos e eliminar restos de culturas contaminados (DUSI, 1995).

Em 1929, McKinney descobriu que havia interferência mútua entre estirpes de vírus de plantas, o que proporcionou uma premissa para o uso de proteção cruzada contra as viroses. Atualmente, muitos estudos têm sido realizados com efeitos protetores em plantas de alho, frutas cítricas, maçãs, tomates dentre outras plantas. Em 2005, Takaki e colaboradores utilizaram estirpes severas de LYSV e atenuada, utilizando a proteção cruzada, e o mesmo procedimento fizeram com o OYDV (TAKAKI et al., 2006).

Atualmente, a metodologia que tem sido empregada no controle dos vírus em alho, é a associação de termoterapia e cultura de tecido, indexação para os principais vírus e propagação controlada para obtenção de material básico de alta qualidade sanitária para multiplicações posteriores (PAVAN, 1998).

5. REFERÊNCIAS

BAI, Y.; ZHANG, W.; LI, X.; SHEN, Y.; GAO, Y.; FAN, G.; GENG, H.; MENG, X. Advances in research of garlic virus diseases. **Journal of Northeast Agricultural University**, v.17, n.2, p.85-92, 2010.

BARG, E.; LESEMANN, D.E.; VETTEN, H.J. Identification, partial characterization, and distribution of viruses infecting allium crops in South and Southeast Asia. **Acta Horticulturae**, n. 358, p. 251-258, 1994.

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

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

CAFRUNE, E.E.; BALZARINI, M.; CONCI, V. Changes in the concentration of an *Allexivirus* during the crop cycle of two garlic cultivars. **Plant Disease**, v.90, p.1293-1296, 2006.

CHANG, M. U.; RHO, M. C.; PARK, W. W. Studies on the virus in *Allium tuberosum* and *Allium sativum*. **Korean Journal of Natural Science**, v.11, p.267-282, 1991.

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**, 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, n.15, p. 5897–5902, 2008.

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

CONCI, V.C.; CANAVELLI, A.E.; BALZARINI, M.G. The distribution of garlic viruses in leaves and bulbs during the first year of infection. **Journal of Phytopathology**, v.158, p.186-193, 2010.

DANIELS, J. Occurrence of virus in garlic in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, n 24, p. 91, 1999.

DELECOLLE, B.; LOT, H. Viroses de l'ail: mise en evidence et essais de caracterization 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**, Netherlands, v. 99, p. 233-257, 1993.

DUSI, A.N.; FAJARDO, T.V.M.; CUPERTINO, F.P. Serological identification of garlic (*Allium sativum* L.) viruses in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**. v.19 (supl.), p.298, 1994.

DUSI, A. N. Doenças causadas por vírus em alho. **Informe Agropecuário**, v 17, n. 183, p. 19-21, 1995.

EBI, M.; KASAI, N.; MASUDA, K. Small Inflorescence Bulbils Are Best for Micropropagation and Virus Elimination in Garlic. **Hortscience**, v.35, n.4, p.735–737, 2000.

EL-WAHAB, A.S.A. Aphid-transmission efficiency of two main viruses on garlic in Egypt, Onion yellow dwarf virus (OYDV-G) and Leek yellow stripe virus (LYSV-G). **Academic Journal of Entomology**, v.2, n.1, p.40-42, 2009.

FAJARDO, T.V.M. **Estudo da degenerescência por viroses e caracterização molecular do complexo viral da cultura do alho (*Allium sativum* L.)**. 1998, 121 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)–Universidade de Brasília, Brasília, 1998.

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**, v. 26, n. 3, p. 619-626, set. 2001.

FIDAN., H.; BALAGLU, S.; KOÇ, G.; BIRISIK, N. New virus diseases for Turkey detected in onion and garlic: Onion yellow dwarf virus and Shallot latent virus. In Turkey's National 3rd Plant Protection Congress, p.131, Van, Turkey, July 2009.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3 ed. Viçosa: Editora UFV, 2007. Cap. 15, p.255-278.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.63, p.9-16, 1997.

GRAICHEN, K.; LEISTNER, H.U. Zwiebrlgelbstreifen virus (*Onion yellow dwarf virus*) verursacht Knoblauchmosaik, 1987. In: VAN DIJK, P. Carlavirus isolates from cultivated

Allium species represent three viruses. **Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 99, p. 233-257, 1993.

HELGUERA, M.; LUNELLO, P.; NOME, C.; CONCI, V.C. Advances in the purification of filamentous viruses from garlic and in antisera production. **Acta Horticulturae**, v.433, p.623-630, 1997.

KANG, S.G.; BONG, J.K.; EUN T.L.; MOO, U.C. Allexivirus Transmitted by Eriophyid Mites in Garlic Plants. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v.17, n.11, p.1833-1840, 2007.

KING, A.M.Q., LEFKOWITZ, E., ADAMS, J.M., CARSTENS, E.B. **Virus Taxonomy**, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses 1327, p. 2012.

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**, v.3, n.4, p.97-100, 2007.

LEISOVA-SVOBODOVA, L.; KARLOVA-SMEKALOVA, K. Detection of garlic using SYBR green real-time reverse transcription-Polymerase chain reaction. **Journal of Phytopathology** , v.159, p.429-434, 2011.

LSPA - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, v.26 n.6 p.1-81 junho.2013.

LUCINI, M.A. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina. Florianópolis: Epagri/Cepa, v.1. Disponível em <http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/Sintese_2012/sintese%202012.pdf>. Acesso em 20 de agosto de 2013.

LUNELLO, P.; MANSILLA, C.; CONCI, V.; PONZ, F. Ultra-sensitive detection of two garlic potyvirus using real-time fluorescent (Taqman[®]) RT-PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v.118, p.15-21, 2004.

LOT, H.; CHOVELON, V.; SOUCHE, S.; DELECOLLE, B. Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yields loss of three French garlic cultivars. **Plant Disease**, v.82, p.1381-1385, 1998.

MAESO, C.; PAGANI, C.; CONCI, V.C.; MIRABELLE, L. Studies on viruses affecting garlic in Uruguay. **Acta Horticulturae**, p.617-622, 1997.

MARYS, E.; CARBALLO, O.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M.L. Isolation and characterization of viruses present in four clones of garlic (*Allium sativum*) in Venezuela. **Journal of Phytopathology**, v. 142, p.227-234, 1994.

MASCARENHAS, M.H.T. Clima, cultivares, épocas de plantio e alho planta. **Informe Agropecuário**, v. 48, n. 4, p. 15-24, 1978.

MATHEW, D. A note on frost induced garlic (*Allium sativum* L. var. *sagittatum* Kuz.) mutant with larger aerial bulbils. **Journal of Spices and Aromatic Crops**, v.16, n.2, p.122-124, 2007.

MCKINNEY, H.H. Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa, and Gibraltar. **Journal Agriculture Research** v.39 p.557–578, 1929.

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, v.39, n.8, p.735-740, 2004.

MELO FILHO, P.A.; DUSI, A.N.; COSTA, C.L.; RESENDE, R.O. Colonização de plantas de alho por *Neotoxoptera formosana* no DF. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.929-930, 2005.

MENEZES SOBRINHO, J.A. Origem e Botânica do Alho. **Informe Agropecuário**, v.4, n.48, p.14, 1978.

MESSIAEN, C.M. Thirty years of France experience in production of disease-free garlic and shallot mother bulbs. **Acta Horticulturae**, v.358, p.275-279, 1994.

MITUTI, T. **Levantamento das principais viroses na cultura do alho (*Allium sativum* L.) e caracterizacao de carlavirus em algumas regioes produtoras do Brasil**. 2009, 61f. Dissertacao (Mestrado)–Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2009.

MITUTI, T.; MARUBAYASHI, J.M.; MOURA, M.F.; KRAUSE-SAKATE, R.; PAVAN, M.A. First Report of *Shallot latent virus* in Garlic in Brazil. **Plant Disease**, v.95, n.2, p.227, 2011.

MOTA, L.D.C.; DELLAVECCHIA, 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 *Pfaffiaglomerata* in Brazil. **Plant Pathology**, v.53, p.368-373, 2004.

MÜLLER, J.J.V.; SILVA, A.C.F. Clima, cultivares e épocas de plantio para o alho. In: **A cultura do alho em Santa Catarina**. Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária, Florianópolis, 1983. p.22-26.

MURPHY, S.F. et al. A tyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of tobacco vein mottling virus links the VPg to the viral RNA. **Journal of Virology**, v. 65, p.511-513, 1991.

OLIVEIRA, M.O. **Caracterização de Allexivirus em alho nas regioes Sul, Sudeste e Centro-Oeste brasileiro e analise da sanidade vegetal do alho obtido por cultura de meristema e termoterapia na FCA/UNESP**, 2013, 59 f. Dissertacao (Mestrado)–Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2013.

- 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.
- POSPISIL, P. Growing garlic from bulbils. **The Canadian Organic Grower**, 2010.
- SALOMON, R. Virus Diseases in Garlic and the propagation of virus-free plants. In: RABINOWITCH, H. D.; CURRAH, L.(Eds.) **Allium Crop Science: Recent Advances**. New York: CABI, 2002. Cap.13, p. 311-327.
- SATURNINO, H. M.; CRUZ FILHO, J. Doenças da cebola. **Informe Agropecuário**, v. 6, n. 62, p. 47-59, 1980.
- SONG, S.I.; SONG, J.T.; CHANG, M.U.; LEE, J.S.; CHOI, Y.D. Identification of one of the major viruses infecting garlic plants, garlic virus X. **Molecules and Cells**, v.7, n.6, p.705-709, 1997.
- SUMI, S.; MATSUMI, T.; TSUNEYOSHI, T. Complete nucleotide sequences of garlic viruses A and C, members of the newly ratified genus Allexivirus. **Archives of Virology**, v.144, n.9, p.1819-1826, 1999.
- TAKAICHI, M.; YAMAMOTO, M.; NAGAKUBO, T.; OEDA, K. Four garlic viruses identified by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction and their regional distribution in Northern Japan. **Plant Disease**, vol. 82, n.6, p.694-698, 1998.
- TAKAKI, F.; SANO, T.; YAMASHITA, K.; FUJITA, T.; UEDA, K.; KATO, T. Complete nucleotide sequences of attenuated and severe isolates of *Leek yellow stripe virus* from garlic in northern Japan: identification of three distinct virus types in garlic and leek worldwide. **Archives of Virology**, v.150, p.1135-1149, 2005.
- TAKAKI, F.; SANO, T. The complete nucleotide sequence of attenuated onion yellow dwarf virus: a natural potyvirus deletion mutant lacking the N-termina 192 amino acids of HC-Pro. **Archives of Virology**, v.151, n.7, p.1439-1445, 2006.
- TASKUN, H.; BAKTEMUR, G.; KURUL, M.; BYYUKALACA, S. Use of tissue culture techniques for producing virus-free plant in garlic and their identification through real-time PCR. **The Scientific World Journal**, v.2013, p.1-5, 2013.
- TORRICO, A.K.; CONCI, V.A. First Report of *Shallot latent virus* in Garlic in Argentina. **Plant Disease**, v.94, n.7, p.915, 2010
- TSUNEYOSHI, T; MATSUMI, T; , DENG, T. C.; SAKO, I.; SUMI, S. Differentiation of *Allium* carlaviruses isolated from different parts of the world based on the viral coat protein sequence. **Archives of Virology**, v. 143, p. 1093-1107, 1998.
- URCUQUI-INCHIMA, S., HAENNI, A.-L., BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of funtions. **Virus Research**, v.74, p.157-175, 2001.

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

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**, v.62, p.211-220, 1987.

WALKEY, D.G.A.; ANTILL, D.N. Evaluation of viruses-free and virus-infected garlic (*Allium sativum* L.). **Journal of Horticultural Science**. v.64, n.1, p.60, 1989.

ZERBINI, F.M.; CARVALHO, M.G.; ZAMBOLIM, E.M. Movimento de vírus na planta. In: ZERBINI, F.M.; CARVALHO, M.G.; ZAMBOLIM, E.M. **Introdução à Virologia Vegetal**. 2 ed., Viçosa: UFV, 2006. Cap.7, p.71-86.

CAPÍTULO 01

Título: Estudo da degenerescência do alho-semente livre de vírus durante três anos de cultivo consecutivos. Study of degeneration of garlic virus free for three consecutive crop years.

Redigido conforme as normas da revista *Scientia Horticulturae* (Short Communication)

Estudo da degenerescência do alho-semente livre de vírus durante três anos de cultivo consecutivos. Study of degeneration of garlic virus free for three consecutive crop years.

Mituti, T.^a, Imaizumi, V.M.^a, Oliveira, M.L.^a, Nardini, J.P.C.^a, Krause-Sakate, R.^a, Pavan, M.A.^{ab}.

a. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – Faculdade de Ciências Agrômicas, Campus de Botucatu. Departamento de Proteção Vegetal, Rua Jose Barbosa de Barros, 1780, Botucatu, SP, Brasil, 18610-370.

b. Corresponding author: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – Faculdade de Ciências Agrômicas, Campus de Botucatu. Departamento de Proteção Vegetal, Rua Jose Barbosa de Barros, 1780, Botucatu, SP, Brasil, 18610-370. Phone number +55-14-38807474. E-mail: mapavan@fca.unesp.br

RESUMO

Os vírus em alho geralmente formam um complexo entre os gêneros *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus*, reduzindo a sua produtividade. A utilização de materiais isentos de vírus é uma alternativa viável, entretanto é necessário um estudo de quantas gerações esse alho-semente pode ser plantado sem que cause a degenerescência. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar durante três anos de cultivos sucessivos, a taxa de reinfecção pelos vírus e avaliar a produtividade de cada ano para verificar o período em que as sementes livres de vírus podem ser multiplicadas sem que ocorra a queda da produtividade. No primeiro ano (2010) foram selecionados clones isentos de vírus para multiplicação nos anos de 2011, 2012 e 2013. Em cada ano as amostras foram coletadas e analisadas por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos universais para os três gêneros descritos. No primeiro ano a produtividade teve um aumento de 45,63% em relação à testemunha 100% infectada, no segundo ano 37,10% e no terceiro ano 13,92%. A taxa de reinfecção no último ano foi de 73,5% para potyvirus, 29% para allexivirus e as plantas estavam isentas de carlavirus. De acordo com os dados obtidos, pôde-se observar que até o terceiro ano ainda é viável a utilização dessas sementes no campo, e possivelmente após o quarto ou quinto ano a produção poderá se igualar às sementes 100% infectadas. No entanto, é necessário analisar esse material ao longo de vários anos, pois outros fatores podem interferir no desenvolvimento da planta e na produtividade.

Palavras-chave: produtividade; reinfecção; potyvirus; carlavirus; allexivirus

ABSTRACT

Viruses in garlic usually occur in complex between genera *Potyvirus*, *Carlavirus* and *Allexivirus*, reducing the productivity. Using garlic virus-free is a viable alternative, requiring a study of degeneration of garlic seeds. Thus, the aim of this study was to analyze three years of successive growth, verify the rate of reinfection by viruses and evaluate the productivity of each year to estimate the period in which the seeds free of virus may multiply without the decline in productivity. In the first year (2010) clones free of viruses were selected to multiply in 2011, 2012 and 2013. In each year the samples were collected and analyzed by RT-PCR with universal primers for the three genres described. The productivity in the first year increased by 45,63% compared to control 100% infected with viruses, in the second year 37,10% and 13,92% in the third year. The reinfection rate in 2013 was 73,5% for potyvirus, 29% for Allexivirus and none for carlavirus. According to the data, it was observed that until third year it is still possible to use these seeds in the field, and perhaps after fourth or fifth year, the productivity will be equal to 100% infected seeds. However, it is necessary to analyze this material over many years, as other factors may affect the development of the plant and productivity.

Keywords: Productivity; reinfection; potyvirus; carlavirus; allexivirus

A produção de alho no Brasil em 2012 foi de 107.054 toneladas, e o País necessitou importar 163.670 toneladas, o que corresponde quase 53% a mais do volume produzido. Aproximadamente 61% do total importado provêm da China e 37,05% da Argentina (Levantamento Sistemático de Produção Agrícola, 2013; LUCINI, 2012). Através desses dados é possível verificar a necessidade do Brasil em aumentar o rendimento e a qualidade dos bulbos produzidos, para que seja possível competir com o mercado externo (China e Argentina).

A cultura do alho é constantemente afetada pelo complexo viral formado por vírus pertencentes a diferentes gêneros, e isso ocorre devido a sua propagação vegetativa que propicia o acúmulo dos vírus de um ciclo de produção para outro. Há mais de dez espécies de vírus descritas no mundo, sendo as espécies relatadas no Brasil: *Leek yellow stripe virus* (LYSV) e *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) pertencentes ao gênero *Potyvirus*; *Garlic common latent virus* (GarCLV) e *Shallot latent virus* (SLV) do gênero *Carlavirus*; e do gênero *Allexivirus* há seis espécies descritas, *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV), *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B), *Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D) e *Garlic virus X* (GarV-X) (DUSI, et al., 1994; MELO FILHO et al., 2004; MITUTI et al., 2011; OLIVEIRA, 2013).

Uma das formas de melhorar a qualidade e produtividade é a termoterapia, associada à cultura de meristema, que possibilita a produção de sementes de alho livres de vírus (CONCI et al., 1991).

Com a utilização dessas sementes sadias, há um aumento no vigor vegetativo e a altura da planta em relação às sementes convencionais infectadas (WALKEY e ANTILL, 1989), e de acordo com estudos realizados por Resende e colaboradores (2000), a produção comercial pode ter um aumento em até 50,87%.

Na China, após cinco gerações de multiplicação de clones provenientes de cultura de meristema, Lin (1985) observou que 52,1% das plantas estavam assintomáticas, enquanto que plantas oriundas de multiplicação convencional apresentavam somente 7,14% de plantas livres de vírus.

Com o estudo da análise de degenerescência das plantas de alho livres de vírus, é possível determinar o número de gerações em que as sementes podem ser multiplicadas sem que ocorra redução drástica no crescimento e queda na produtividade. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar em condições brasileiras, quantas

gerações sucessivas o produtor poderá utilizar a mesma semente para plantios consecutivos, obtendo melhor produtividade comparada com o alho-semente existente no mercado.

Clones de alho livres de vírus (cv. Cacador) obtidos através de termoterapia e cultura de meristema, técnica desenvolvida e obtida no laboratório da Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Campus de Botucatu (Pavan, 1998), foram multiplicados em estufa com tela anti-afídeo e plástico repelente a insetos, localizados na região de Guarapuava/PR. Inicialmente foram coletadas 100 plantas assintomáticas (ano de 2010) e as amostras foram analisadas por RT-PCR para os gêneros *Carlavirus*, *Potyvirus* e *Allexivirus*, a fim de selecionar somente os clones isentos de vírus.

Primeiramente foi realizada a extração de RNA total das plantas coletadas, de acordo com protocolo descrito por Bertheau e colaboradores (1998).

As amostras foram analisadas por RT-PCR em uma só etapa utilizando o Kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega). Para um volume de 25 µL adicionou-se 12,5 µL de PCR Master Mix 2X, 10µM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade da transcriptase reversa AMV (*Avian myeloblastosis virus*, marca Promega a 15 unidades/µL), 2,5 µL de RNA e Nuclease Free Water para completar o volume de 25 µL. Foram utilizados oligonucleotídeos universais (Quadro 1) para detecção dos vírus pertencentes aos gêneros *Allexivirus* (Oliveira, 2013), *Carlavirus* (Mituti, 2009) e *Potyvirus* (Gibbs e Mackenzie, 1997; Mota et al, 2004).

Quadro 1 – Oligonucleotídeos utilizados para detecção dos gêneros *Carlavirus*, *Potyvirus* e *Allexivirus*.

Gênero	Oligonucleotídeo	Sequência
Carlavirus (370bp)	SLV/GCLV 7303	5' – GGNTKKGAAWCTGGGAGDCC – 3'
	SLV/GCLV 7665	5' – CATKTMATTCCAAACAACNNGGYGC – 3'
Potyvirus (800bp)	WCIEN	5' – ATG GTT TGG TGY ATY GAR AAT – 3'
	PV1	5' – GAT TTAGGTGACACTATAGT ₍₁₅₎ – 3'
Allexivirus (240bp)	Cpallexi-senso 2	5' – CTACCACAAYGGNTCVTC – 3'
	Cpallexi-anti 1	5' – CACNGCGTTRAAGAARTC – 3'

Os bulbos sadios (matriz - 2010) foram tratados com fungicida Sumilex® (Procimidona), conforme recomendação do fabricante, e acondicionados em sacos plásticos, para posterior plantio no ano de 2011 (geração 1). Quarenta e cinco dias que antecederam o plantio, os bulbos foram colocados em câmara fria para vernalização. Após esse procedimento, foi feito a contagem do número de bulbilhos, que foram divididos em 4 partes (4 blocos) para realizar o plantio em Santa Juliana/MG, em uma área de multiplicação de sementes (campo aberto). O experimento foi realizado com 2 tratamentos, sendo o tratamento 1 utilizando sementes provenientes de cultura de tecido (isentos de vírus), divididos em 4 blocos (I a IV) distribuídos ao acaso no campo de produção comercial, e o tratamento 2 utilizando sementes 100% infectadas, cultivadas pelo produtor durante vários ciclos (testemunha).

Sessenta dias após o plantio, foram coletadas as folhas mais jovens de todas as plantas, para extração de RNA total e análise por RT-PCR, como descrito anteriormente.

Nos anos de 2012 (geração 2) e 2013 (geração 3) foram realizados os mesmos procedimentos descritos acima. As sementes coletadas no ano anterior ao plantio foram misturadas, e retiradas ao acaso para plantio. No ano de 2012, foram semeados 96 bulbilhos por tratamento, e no ano de 2013 foram semeados 200 bulbilhos por tratamento.

No quadro 2 estão descritos de forma resumida, as etapas do experimento.

A época de plantio e as operações de condução (irrigação, adubação, controle químico) foram realizadas conforme padrões tradicionais do produtor.

Quadro 2 – Condução do ensaio em campo para estudo de degenerescência do alho livre de vírus.

Plantio	Material para plantio	Local de plantio
Ano 01 (2010)	Plantio de clones de alho livres de vírus (aclimatização)	Estufas com telado anti-afídeo (Guarapuava/PR)
Ano 02 (2011)	Plantio de 453 bulbilhos do ano 01 (multiplicação de semente)	Campo de produção comercial (Santa Juliana/MG)
Ano 03 (2012)	Plantio de 384 bulbilhos do ano 02 (multiplicação de semente)	Campo de produção comercial (Santa Juliana/MG)
Ano 04 (2013)	Plantio de 400 bulbilhos do ano 03 (produção comercial)	Campo de produção comercial (Santa Juliana/MG)

Das 100 plantas assintomáticas analisadas (2010), somente 36 plantas apresentaram-se negativas para todos os gêneros (*Carlavirus*, *Potyvirus* e *Allexivirus*), e nos anos seguintes, esses clones isentos de vírus foram utilizados para multiplicação em campos comerciais.

No primeiro ano do estudo da degenerescência do alho-semente livre de vírus (2011), das 453 amostras analisadas, 201 estavam infectadas com potyvirus (44,37%), 6 amostras positivas para carlavirus (1,32%) e 188 para allexivirus (41,5%) (Tabela 1). O peso médio de cada bulbo foi de 36,70 gramas (Tabela 2), com aumento da produtividade de 45,63% em relação à testemunha 100% infectada.

Em 2012, das 384 amostras, 223 havia a presença de potyvirus (58,07%), 177 amostras com allexivirus (46,09%) e todas as amostras isentas de carlavirus (Tabela 1). No segundo ano, houve um aumento de 37,10% da produtividade, comparado com a testemunha, tendo peso médio do bulbo de 38,28 gramas (Tabela 2).

No último ano de estudo (2013), 400 amostras foram analisadas, onde 294 foram positivas para potyvirus (73,5%), para allexivirus 116 amostras (29%) e nenhuma amostra positiva para carlavirus (Tabela 1). No terceiro ano de plantio consecutivo, o peso médio de cada bulbo foi de 34,46 gramas, com aumento de 13,92% de da produtividade, quando comparadas com a testemunha.

De acordo com experimentos realizados por Conci e colaboradores (2003), com mais de dois ciclos de cultivo sucessivo da cultura do alho, foi possível observar o aumento na porcentagem de produção de bulbos pequenos, sendo que o peso

dos bulbos tem declínio progressivo até o terceiro ano de cultivo. Entretanto, após cinco anos de cultivo, a produção ainda foi elevada, quando comparado com plantas infectadas com o complexo viral.

Silva e colaboradores (2010) observaram que durante nove anos consecutivos para as cultivares provenientes de cultura de tecido (Gigante Roxo, Gravata, Gigante de Lavinia e Gigante Roxão), na região de Lavras/MG, a produtividade foi superior quando comparada com as cultivares de multiplicação convencional. A produção tende a reduzir a partir do terceiro ou quarto ano de cultivos sucessivos, dependendo da cultivar.

Fajardo (1998) observou que no primeiro ano de cultivo a produtividade de sementes livres de vírus foi de 10,48 t/ha, enquanto que o alho infectado foi de 4,13 t/ha. Já no segundo ano, 13,97 t/ha para livres de vírus (obtidos no ano anterior), e 5,47 t/ha utilizando sementes infectadas. O aumento no peso dos bulbos chegou a 157,51% após o segundo ano de cultivo sucessivo. A taxa de reinfecção do material sadio foi de apenas 20% após o segundo ano de cultivo em campo. A tolerância da cultivar e o nível populacional dos vetores poderá influenciar na taxa de reinfecção através de sucessivas gerações de multiplicação (Graichen et al., 1990).

Foi possível observar a redução gradual da produtividade, devido à infecção viral que ocorreu naturalmente em campo, durante os períodos avaliados, no entanto ainda há vantagem na utilização dessas sementes até três anos sucessivos de cultivo do alho, por ter produtividade superior as sementes 100% infectadas.

Nas condições de Santa Juliana (Cerrado Mineiro), possivelmente após o quarto ou quinto ano de multiplicação dessas sementes, a produção poderá se igualar à testemunha 100% infectada, no entanto, há a necessidade de avaliar esse material ao longo de vários anos e em outras localidades, pois outros fatores podem influenciar no desenvolvimento da planta (clima, solo, irrigação, adubação), bem como a taxa de reinfecção e degenerescência, devido a alta ou baixa população de insetos vetores presentes no campo.

Tabela 1. Número de plantas analisadas para a presença dos gêneros *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus*, durante os períodos de 2011 a 2013.

Blocos	2011				2012				2013			
	N. plantas	Poty	Carla	Allex	N. plantas	Poty	Carla	Allex	N. plantas	Poty	Carla	Allex
I	110	74 (67,27%)	0	19 (17,27%)	96	66 (68,75%)	0	31 (32,29%)	100	60 (60%)	0	32 (32%)
II	120	62 (51,66%)	5 (4,16%)	63 (52,5%)	96	58 (60,42%)	0	44 (45,83%)	100	85 (85%)	0	27 (27%)
III	116	35 (30,17%)	1 (0,86%)	52 (44,83%)	96	50 (52,08%)	0	50 (52,08%)	100	64 (64%)	0	22 (22%)
IV	107	30 (28,04%)	0	54 (50,47%)	96	49 (51,04%)	0	52 (54,17%)	100	85 (85%)	0	35 (35%)
Total	453	201 (44,37%)	6 (1,32%)	188 (41,5%)	384	223 (58,07%)	0	177 (46,09%)	400	294 (73,5%)	0	116 (29%)

Tabela 2. Peso médio de cada bulbo (gramas) referente aos 2 tratamentos realizados nos anos de 2011 a 2013.

Tratamentos	Blocos	2011		2012		2013	
		Peso médio do bulbo (g)	Média (blocos)	Peso médio do bulbo (g)	Média (blocos)	Peso médio do bulbo (g)	Média (blocos)
1 (livre de vírus)	I	36,70	36,70	42,71	38,28	34,45	34,46
	II	40,41		36,98		36,41	
	III	37,93		35,42		34,54	
	IV	31,77		38,02		32,43	
2 (Testemunha ¹)	I	25,20		27,92		28,72	
	CV	7,34		2,98		2,70	

¹ = Testemunha 100% infectadas por vírus.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Processo 472032/2010-0) e a FAPESP (Processo 2010/16148-9) pelo auxílio financeiro concedido; e aos Agrônomos Isao Imaizumi e Mauro Uyeno (Grupo Genove) pelo auxílio na condução dos experimentos.

REFERÊNCIAS

1. Bertheau, Y.; Frechon, D.; Toth, I.K.; Hyman, L.J., 1998. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). IN: Perombelon, M. C. M.; van der Wolff, J. M. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes. Dundee:Scottish Crop Research Institute Occasional Publication.
2. Conci, V.C.; Nome, S.F. 1991. Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. *Journal of Phytopathology* 132:189-192.
3. Conci, V.C.; Canavelli, A.; Lunello, P. 2003. Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. *Plant Disease* 87(12):1411-1415.
4. Dusi, A.N.; Fajardo, T.V.M.; Cupertino, F.P., 1994. Serological identification of garlic (*Allium sativum*L.) viruses in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 9 (supl.):298.
5. Fajardo, T.V.M. Estudo da degenerescência por viroses e caracterização molecular do complexo viral da cultura do alho (*Allium sativum* L.). 1998, 121 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)–Universidade de Brasília, Brasília, 1998.
6. Gibbs, A.; Mackenzie, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, v.63, p.9-16, 1997.
7. Graichen, K.; Kromat, H.; Meyer, U. 1990. Effect of virus infection on the yield performance of the garlic cultivar Thuringer. 35(9):266-267, 1988. In *Review of plant pathology*. Wallingford 69:2.
8. Lin, C.H. 1985. Studies on the raising technique of healthy garlic clones in the tropics. *Journal of Agricultural Resources of China, Fengshan* 34(3):279-291.
9. LSPA - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, v.26 n.6 p.1-81 junho.2013.

10. Lucini, M.A. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina. Florianópolis: Epagri/Cepa, v.1. Disponível em <http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/Sintese_2012/sintese%202012.pdf>. Acesso em 20 de agosto de 2013.
11. Melo Filho, P.A.; Nagata, T.; Dusi, A.N.; Buso, J.A.; Torres, A.C.; Eiras, M.; Resende, R.O., 2004. Detection of three *Allexivirus* species infecting garlic in Brazil. *Pesquisa agropecuária brasileira* 39(8):735-740.
12. Mituti, T. Levantamento das principais viroses na cultura do alho (*Allium sativum* L.) e caracterização de carlavirus em algumas regiões produtoras do Brasil. 2009, 61f. Dissertação (Mestrado)—Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2009.
13. Mituti, T.; Marubayashi, J.M.; Moura, M.F.; Krause-Sakate, R.; Pavan, M.A., 2011. First Report of *Shallot latent virus* in Garlic in Brazil. *Plant Disease* 95(2):227.
14. Mota, L.D.C.; DellaVecchia, 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*, v.53, p.368-373, 2004.
15. Oliveira, M.O., 2013. 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. Dissertação. Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, Brazil.
16. 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.
17. Resende, F.V.; Gualberto, R.; Souza, R.J. 2000. Crescimento e produção de clones de alho provenientes de cultura de tecidos e de propagação convencional. *Scientia Agricola* 57(1):1-9.

18. Silva, E.C.; Souza, R.J.; Pasqual, M. Diferencas de produtividade entre cultivares de alho obtidas por cultura de tecidos e multiplicação convencional, em um período de nove anos consecutivos. **Bioscience Journal**, v. 26, n.5, p.692-697, 2010.
19. Walkey, D.G.A.; Antill, D.N. 1989. Evaluation of viruses-free and virus-infected garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Horticultural Science* 64(1):60.

CAPÍTULO 2

Título: Análise de vírus em bulbilhos aéreos de alho provenientes dos escapes florais.

Analysis of viruses in aerial bulbils from garlic plants

Redigido de acordo com as normas da revista *Journal of Plant Pathology*

ANÁLISE DE VÍRUS EM BULBILHOS AÉREOS DE ALHO PROVENIENTES DOS ESCAPES FLORAIS.

ANALYSIS OF VIRUSES IN AERIAL BULBILS FROM GARLIC PLANTS

Tatiana Mituti^a; Milena Leite Oliveira^a, João Paulo Calore Nardini^a, Maria Isabel Motta Hoffmann^a; Renate Krause Sakate^a; Marcelo Agenor Pavan^{ab}.

^a*Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Faculdade de Ciências Agronômicas, Campus de Botucatu. Departamento de Proteção Vegetal, Rua José Barbosa de Barros, 1780, Botucatu, SP, Brasil, 18610-370.*

^b*Corresponding author: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Faculdade de Ciências Agronômicas, Campus de Botucatu. Departamento de Proteção Vegetal, Rua José Barbosa de Barros, 1780, Botucatu, SP, Brasil, 18610-370. Phone number: +55-14-38807474. E-mail: mapavan@fca.unesp.br.*

RESUMO

Em campos de produção comercial de alho é comum observar plantas naturalmente infectadas por vírus dos gêneros *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus*. Os bulbilhos aéreos podem ser uma alternativa para a propagação de plantas de alho livres de vírus. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a taxa de transmissão dos vírus de plantas infectadas para os bulbilhos aéreos. Esses bulbilhos aéreos obtidos de plantas infectadas foram analisados por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos universais para os gêneros *Potyvirus*, *Allexivirus* e *Carlavirus*. A taxa de transmissão foi de 83,33% para potyvirus, 20% para carlavirus e 65% para allexivirus. Os resultados demonstraram que a transmissão dos diferentes vírus do bulbo para os bulbilhos

aéreos é elevada, inviabilizando a utilização direta dos bulbilhos aéreos provenientes de plantas matrizes infectadas por vírus. Esta metodologia deve ser utilizada somente a partir de plantas isentas de vírus.

Palavras-chaves: potyvirus, carlavirus, allexivirus, propagação.

ABSTRACT

In commercial fields of garlic production is common to observe plants naturally infected by virus of genera *Potyvirus*, *Carlavirus* and *Allexivirus*. Previous studies indicate that the aerial bulbils may be indicated for propagation of garlic plants free of virus. Thus, the aim of this study was to analyze the rate of transmission of viruses to aerial bulbils and verify the feasibility of the utilization of these seeds for propagation in the field. Microbulbils obtained from infected plants were analyzed by RT-PCR using universal oligonucleotides for three genres, and it was possible to observe that the rate of transmission was 83,33% for potyvirus, 20% for carlavirus and 65% for allexivirus. The results showed that the transmission of different viruses to the bulbils is high, preventing the direct use of aerial bulbils from virus-infected plants. This methodology should be used only from plants free of viruses.

Keywords: potyvirus, carlavirus, allexivirus, propagation.

1. INTRODUÇÃO

A redução na produção de alho pode ser ocasionada devido ao acúmulo de um complexo de vírus dos gêneros *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus*, que são transmitidos de uma geração para outra, através da propagação vegetativa. No Brasil, há duas espécies de potyvirus descritas em alho: *Leek yellow stripe virus* (LYSV) e *Onion yellow dwarf virus* (OYDV); duas espécies de carlavirus: *Garlic common latent virus* (GarCLV) e *Shallot latent virus* (SLV); e seis espécies de allexivirus: *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV), *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B), *Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D) e *Garlic virus X* (GarV-X) (Dusi, et al., 1994; Melo Filho et al., 2004; Mituti et al., 2011; Oliveira, 2013).

Para obtenção de plantas livres de vírus, o método mais utilizado até o momento é a termoterapia associado à cultura de meristema. Utilizando o cultivo *in vitro* de plantas de alho, pode-se evitar ou reduzir a propagação dos vírus de uma geração para outra, permitindo a obtenção de 80 a 95% de plantas livres de vírus (Pavan, 1998; Menezes Junior, 2011).

A obtenção de plantas através da cultura de meristemas é uma técnica onerosa e que demanda tempo, sendo necessários de dois a três anos até a fase de aclimatização e mais alguns anos para multiplicação dos bulbilhos em campos de produção comercial.

O cultivo de alho através de bulbilhos aéreos, obtidos dos escapes florais tem gerado um grande interesse, e essa prática foi iniciada no Canadá para

multiplicação de sementes a um baixo custo, e para evitar a transmissão de doenças de solo (Pospisil, 2010).

Os bulbilhos aéreos são pequenos, comparados aos dentes de alho, podendo variar o tamanho e aparência, de acordo com a cultivar. Em uma única cápsula, pode conter de 4 a 150 bulbilhos (Pospisil, 2010).

No primeiro ano, os bulbilhos têm peso aproximado de 1 grama, que se desenvolverá em um único dente, e após o segundo ano haverá a formação do bulbo completo com peso aproximado de 15 gramas (Mathew, 2007).

Dentro de dois anos, a propagação do alho através de bulbilhos aéreos oferece uma multiplicação 45 vezes maior que o método convencional, e plantios sucessivos das progênies dos bulbilhos têm qualidade superior à produzida a partir dos dentes originados da planta mãe (Mathew et al., 2005; Pospisil, 2010).

Para verificar a viabilidade de multiplicação de bulbilhos aéreos isentos de vírus, o presente trabalho teve como objetivo analisar as plântulas obtidas através de bulbilhos aéreos, provenientes de matrizes infectadas, a fim de verificar a taxa de transmissão de potyvirus, carlavirus e allexivirus.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Dez plantas de alho com sintomas de mosaico foram coletadas no município de São Manuel/SP (2011 - matriz) e analisadas para a presença de vírus. Foi realizada a extração de RNA total, seguindo protocolo descrito por Bertheau e colaboradores (1998).

As amostras foram analisadas por RT-PCR em uma só etapa utilizando o Kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega). Para um volume de 25 µl adicionou-se 12,5 µL de PCR Master Mix 2X, 10µM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade da transcriptase reversa AMV (*Avian myeloblastosis virus*, marca Promega a 15 unidades/µL), 2,5 µL de RNA e Nuclease Free Water para completar o volume de 25 µL. Foram utilizados oligonucleotídeos universais para detecção dos gêneros *Allexivirus* (241bp), *Carlavirus* (370bp) e *Potyvirus* (800bp), conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para detecção dos gêneros *Allexivirus*, *Carlavirus* e *Potyvirus*.

Gênero	Sequências	Referências
<i>Carlavirus</i>	5'-GGNTKKGAAWCTGGGAGDCC-3'	Mituti, 2009
	5'-CATKTMATTCCAAACAACNGGYGC-3'	
<i>Potyvirus</i>	5'-GAT TTA GGT GAC ACT ATA GT ₁₆ -3'	Gibbs & Mackenzie, 1997
	5'-ATG GTT TGG TGY ATY GAR AAT-3'	Mota et al, 2004
<i>Allexivirus</i>	5' CTACCACAAYGGNTCVTC 3'	Oliveira, 2013
	5' CACNGCGTTRAAGAARTC 3'	

Após o desenvolvimento completo da planta, os escapes florais (Figura 1A) foram cortados, e os bulbilhos aéreos foram armazenados, para plantio no ano seguinte (2012 – geração 1). Dez bulbilhos aéreos originados de cada matriz foram semeados em bandejas, com substrato Plantmax, totalizando 100 plantas, e mantidos em casa-de-vegetação. Após 30 dias as folhas originadas da geração 1, foram coletadas e analisadas por RT-PCR, conforme

descrito anteriormente. Os bulbos produzidos após o primeiro e o segundo ano estão demonstrados nas figuras 1B e 1C.

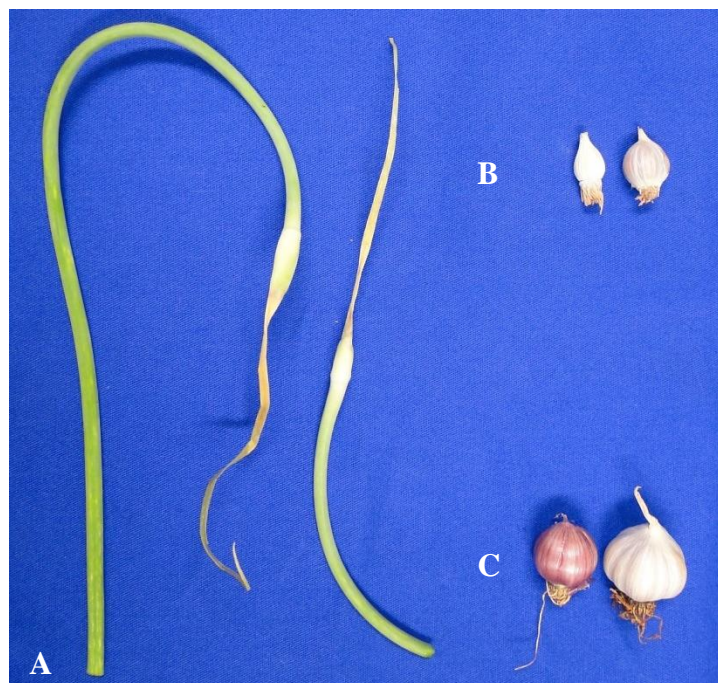


Figura 1 – (A) Escape floral; (B) Bulbilho aéreo com um único dente obtido no primeiro ano; (C) Formação do bulbo completo após o segundo ano.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das dez plantas analisadas (matrizes), nove amostras foram positivas para potyvirus, uma para carlavirus e quatro positivas para allexivirus (Tabela 2).

No ano seguinte (2012), as 100 plantas da geração 1 foram analisadas. Para potyvirus, 75 amostras da primeira geração apresentaram-se positivas. Os bulbilhos aéreos obtidos da matriz negativa também foram analisadas, e uma amostra da planta 6

(geração 1) apresentou-se positiva para potyvirus (Tabela 2). Supõe-se que a concentração do vírus estivesse baixa e não pode ser detectado o vírus na matriz.

Para allexivirus, 28 amostras foram positivas. Duas dessas amostras da geração 1 continham vírus, sendo que a matriz (planta número 3) estava isenta de allexivirus. Neste caso, duas hipóteses podem ser consideradas para a ocorrência de vírus na geração 1: como os allexivirus podem ser transmitidos por ácaros durante o armazenamento, pode ter ocorrido a infecção da geração 1 durante esse período, pois nenhum tratamento com acaricida foi realizado, e as sementes permaneceram juntamente com os demais bulbos infectados; ou o mesmo pode ter ocorrido como explicado anteriormente no caso dos potyvirus, devido a baixa concentração, não foi possível realizar a detecção do vírus em sua matriz.

Para a análise de carlavirus, apenas uma matriz foi detectada a presença do vírus, e para geração 1 somente duas plantas foram positivas.

Tabela 2. Análise para a presença de *Potyvirus*, *Allexivirus* e *Carlavirus* em plantas de alho (matriz) coletadas em 2011 e plantas provenientes de bulbilhos aéreos (geração 1), obtidos das matrizes.

Amostras	2011 (Matriz)			2012 (Geração 1)					
	Poty	Carla	Allexi	Poty	% perpetuação	Carla	% perpetuação	Allexi	% perpetuação
1	+	+	-	9 / 10	90%	2 / 10	20%	0 / 10	-
2	+	-	+	7 / 10	70%	0 / 10	-	6 / 10	60%
3	+	-	-	10 / 10	100%	0 / 10	-	2 / 10	-
4	+	-	+	10 / 10	100%	0 / 10	-	0 / 10	0%
5	+	-	+	8 / 10	80%	0 / 10	-	10 / 10	100%
6	-	-	-	1 / 10	-	0 / 10	-	0 / 10	-
7	+	-	+	9 / 10	90%	0 / 10	-	10 / 10	100%
8	+	-	-	3 / 10	30%	0 / 10	-	0 / 10	-
9	+	-	-	8 / 10	80%	0 / 10	-	0 / 10	-
10	+	-	-	10 / 10	100%	0 / 10	-	0 / 10	-
Total / Média*	9 / 10	1 / 10	4 / 10	75 / 100	83,33%*	2 / 100	20%*	28 / 100	65%*

*= % realizada de acordo com o número de amostras positivas, obtidas das matrizes.

De acordo com trabalhos realizados por alguns pesquisadores, os resultados são contraditórios, pois Etoh e Nakamura (1988), afirmam que há vantagem na utilização de bulbilhos aéreos, pois são livres de nematóides e outras doenças causadas por vírus. Em contrapartida, Verbeek e colaboradores (1995) afirmam que não há diferença para a presença de vírus nos bulbos e nos bulbilhos aéreos, e seria inviável a utilização dos bulbilhos como material propagativo. Pesquisas desenvolvidas na Itália utilizando bulbilhos aéreos para análise, demonstraram infecção de 86% para OYDV, 57% para LYSV, 71% de GarV-X e 29% para GarCLV (Parrano et al., 2012).

Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com Verbeek e colaboradores (1995) e Parrano e colaboradores (2012), onde foi verificada uma elevada taxa de transmissão das matrizes infectadas para os bulbilhos aéreos. Para potyvirus a transmissão foi de 83,33%, para carlavirus 20% e 65% para allexivirus.

Sendo assim, a utilização de bulbilhos aéreos se torna inviável para multiplicação de sementes, quando as matrizes são provenientes de materiais naturalmente infectados, sendo necessária a indexação do material. Entretanto, utilizando matrizes isentas de vírus, a multiplicação dos bulbilhos aéreos se torna viável, pois é um método que possibilita a obtenção de grandes quantidades de sementes, que poderão ser multiplicadas em campo dentro de dois anos, ao contrário da cultura de meristema, que necessita de aproximadamente seis anos a mais, para obter quantidades suficientes para multiplicação em campos comerciais. Além disso, o custo de produção utilizando bulbilhos aéreos para multiplicação será menor. No caso de sementes obtidas através de cultura de meristema, para a compra de sementes suficientes para um hectare, o custo de produção será de aproximadamente 175 mil reais (considerando 350 mil sementes/ha, sendo R\$0,50/semente).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste trabalho (Processo número 2010//16148-9).

4. REFERENCIAS

1. Bertheau, Y.; Frechon, D.; Toth, I.K.; Hyman, L.J., 1998. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). IN: Perombelon, M. C. M.; van der Wolff. J. M. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes. Dundee:Scottish Crop Research Institute Occasional Publication.
2. Dusi, A.N.; Fajardo, T.V.M.; Cupertino, F.P., 1994. Serological identification of garlic (*Allium sativum*L.) viruses in Brazil. Fitopatologia Brasileira 9 (supl.):298.
3. Etoh, T.; Nakamura, N., 1988. Comparison of the peroxidase isozyme between fertile and sterile clones of garlic. 4thEucarpia Allium Symp. 1988:115.
4. Gibbs, A.; Mackenzie, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. Journal of Virological Methods, v.63, p.9-16, 1997.
5. Mathew, D., 2007. A note on frost induced garlic (*Allium sativum*L. var. *sagittatum*Kuz.) mutant with larger aerial bulbils. Journal of Spices and Aromatic Crops 16(2):122-124.
6. Mathew, D.; Ahmed, Z.; Singh, N., 2005. Formulation of flowering index, morphological relationships, and yield prediction system in true garlic aerial seed bulbil production. HortScience 40(7):2036-2039.
7. Melo Filho, P.A.; Nagata, T.; Dusi, A.N.; Buso, J.A.; Torres, A.C.; Eiras, M.; Resende, R.O., 2004. Detection of three *Allexivirus* species infecting garlic in Brazil. Pesquisa agropecuária brasileira 39(8):735-740.

8. Menezes Júnior, F.O.G., 2011. Cultivo in vitro do alho visando a limpeza clonal. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 10(2):158-167.
9. Mituti, T. Levantamento das principais viroses na cultura do alho (*Allium sativum* L.) e caracterização de carlavírus em algumas regiões produtoras do Brasil. 2009, 61f. Dissertação (Mestrado)—Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2009.
10. Mituti, T.; Marubayashi, J.M.; Moura, M.F.; Krause-Sakate, R.; Pavan, M.A., 2011. First Report of *Shallot latent virus* in Garlic in Brazil. *Plant Disease* 95(2):227.
11. Mota, L.D.C.; DellaVecchia, 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*, v.53, p.368-373, 2004.
12. Oliveira, M.O., 2013. 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. Dissertação. Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, Brazil.
13. Parrano, L.; Afunian, M.; Pagliaccia, D.; Douhan, G.; Vidalakis, G., 2012. Characterization of viruses associated with garlic plants propagated from different reproductive tissues from Italy and other geographic regions. *Phytopathologia Mediterranea* 51(3):549-565.
14. Pavan, M.A., 1998. 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. Ph.D. Thesis.

Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, Brazil.

15. Pospisil, P.,2010. Growing Garlic From Bulbils. The Canadian Organic Grower.
16. Verbeek, M.; Van Dijk, P.; Peter M.A., 1995. Efficiency of eradication of four viruses from garlic (*Allium sativum*) by meristem-tip culture. European Journal of Plant Pathology 101:231-239.

CAPÍTULO 3

Título: Concentração de *Potyvirus* em diferentes estágios de desenvolvimento do alho (*Allium sativum* L.). *Potyvirus* concentration at different stages of garlic (*Allium sativum* L.) development.

Redigido de acordo com as normas da revista *Summa Phytopathologica*

Concentração de *Potyvirus* durante diferentes estágios de desenvolvimento do alho (*Allium sativum* L.). *Potyvirus* concentration during different stages of garlic (*Allium sativum* L.) development

Tatiana Mituti; Vitor Massami Imaizumi, Letícia Aparecida Moraes; Renate Krause Sakate; Marcelo Agenor Pavan.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Campus de Botucatu. Departamento de Defesa Fitossanitária, Rua José Barbosa de Barros, 1780, Botucatu, SP, Brasil, 18610-370. E-mail: mapavan@fca.unesp.br.

RESUMO

Duas importantes espécies do gênero *Potyvirus* estão descritas na cultura do alho, *Leek yellow stripe virus* e *Onion yellow dwarf virus*, e devido à propagação vegetativa podem perpetuar de um ciclo para o outro. Uma diagnose precisa é necessária para que não ocorram falhas durante a detecção. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes idades e partes da planta para que possibilitem uma diagnose mais precisa dos potyvirus. As plantas de alho foram analisadas aos 21, 42, 63, 84, 105 e 113 dias após o plantio, separando-as em folhas novas, velhas e bulbilhos, utilizando teste de ELISA indireto com antissoro policlonal anti-potyvirus. As maiores concentrações foram observadas aos 21 e 63 dias nas folhas mais novas, aos 21 dias em folhas mais velhas, e para os bulbilhos aos 84 dias após semeadura. Conhecendo a localização do vírus e a época com maior concentração do mesmo é possível realizar uma diagnose mais confiável de materiais coletados em campo.

Palavras-chave: Diagnose; ELISA.

ABSTRACT

Two important species of genus *Potyvirus* are described in garlic, *Leek yellow stripe virus* and *Onion yellow dwarf virus*, and due to vegetative propagation of garlic, the viruses can perpetuate to another cycle. An accurate diagnosis is necessary, to avoid failures during detection, thus the objective of this study was to analyze different part of the plant, in order to verify the best time for potyvirus diagnosis. Garlic plants were analyzed at 21, 42, 63, 84, 105 and 113 days after planting, separating them into new leaves, old leaves and bulbils, using indirect ELISA with polyclonal antiserum potyvirus. The highest concentrations were observed at 21 and 63 days on younger leaves, in old leaves at 21 days, and bulbs at 84 days after planting. Knowing the location of the virus and the period with highest concentration will produce a more reliable diagnosis of collected materials in the field.

Keywords: Diagnosis; ELISA

1. INTRODUÇÃO

Com a exclusiva propagação vegetativa do alho, há formação do complexo viral entre os gêneros *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus*, e o acúmulo dos vírus de um ciclo para o outro (Tsuneyoshi & Sumi, 1996). Os potyvirus são mais comumente encontrados em plantas de alho, e as duas principais espécies descritas são *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) e *Leek yellow stripe virus* (LYSV) (Maeso et al., 1997). A associação dessas duas espécies pode ocasionar redução de 68,8% no peso dos bulbos. A infecção somente de LYSV pode reduzir até 44,7% e quando infectadas por OYDV 52,8% (Lot et al., 1998).

O controle desses vírus ocorre através da utilização de alho semente sadias, obtidas por cultura de meristema, devidamente certificadas e multiplicadas em estufas com telados anti-afideos para evitar a reinfecção (Conci, 1997).

De acordo com Conci e colaboradores (2010) é necessário conhecer a localização do vírus e em qual parte da planta há uma maior concentração viral, para que seja possível realizar uma diagnose precisa e confiável.

O objetivo desse trabalho foi verificar o pico de concentração dos potyvirus, utilizando a técnica de ELISA indireta, para identificar qual a melhor época de coleta de material em campo para diagnose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado em campos de produção comercial de alho, no ano de 2010, no município de Santa Juliana/MG, divididos em dois blocos, com o total de 100 plantas cada. Para cada análise foram coletadas 10 plantas. Foi utilizada a cultivar Caçador, que possui ciclo intermediário (aproximadamente 120 dias), e foram selecionados alho-semente previamente infectados por potyvirus (LYSV e OYDV).

Através do teste de ELISA indireto, utilizando-se o antissoro policlonal para potyvirus (Agdia Inc., Elkhart, IN), foi realizada a quantificação de materiais coletados aos 21, 42, 63, 84, 105 e 113 dias após semeadura, analisando-se as folhas novas, folhas velhas e os bulbilhos, seguindo o desenvolvimento da planta (Tabela 1). As amostras foram coletadas, pesadas e maceradas na mesma proporção (1:10), e o protocolo de ELISA foi

realizado de acordo com a recomendação do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada a 405 nm (Leitor Multiskan Plus Titertek - ICN).

Tabela 1 - Desenvolvimento da cultura do alho.

Dias	Fases de desenvolvimento
0-5 dias	Germinação
5-20 dias	Desenvolvimento de plântulas (fase de mudas)
20-40 dias	Desenvolvimento vegetativo (desmame)
40-60 dias	Desenvolvimento vegetativo
60-80 dias	Diferenciação
80-120 dias	Bulbificação (enchimento do bulbo)
120-130	Final do ciclo – Senescência natural (colheita)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através das análises realizadas por sorologia, foi possível observar que as maiores concentrações de vírus (absorbância) ocorreram em folhas novas (segunda ou terceira folha abaixo do ápice), entre 21 e 63 dias após o plantio (fase de muda e diferenciação), conforme demonstra a figura 1. Para folhas velhas, a época mais adequada para detecção é aos 21 dias (fase de muda), e após esse período a concentração viral tem um decréscimo gradativo. No caso dos bulbos, a maior concentração foi detectada aos 84 dias (fase de bulbificação).

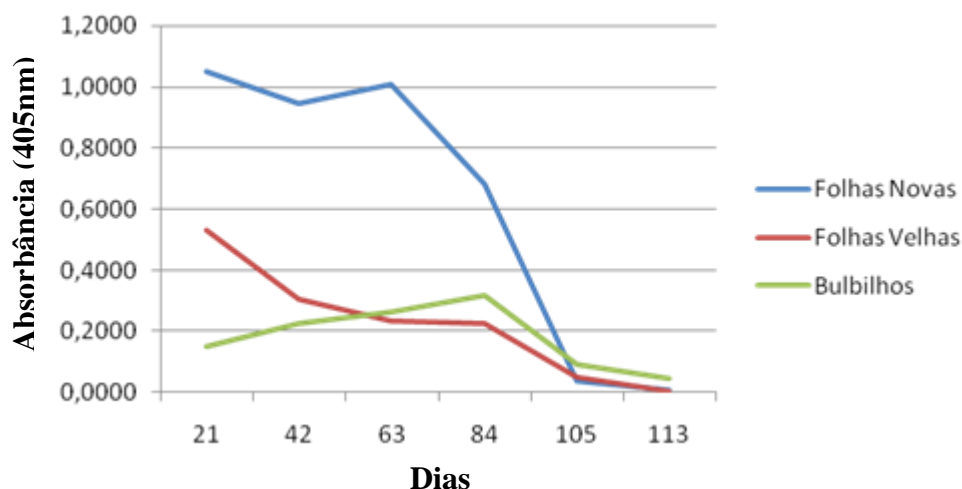


Figura 1 - Média da concentração viral dos dois blocos com relação à época de coleta.

Na Argentina, foram realizados testes para verificar a concentração de LYSV em diferentes épocas do ciclo do alho, utilizando três tipos: Tipo Branco (ciclo de 244 dias), Tipo Vermelho (ciclo de 232 dias) e uma cultivar de ciclo curto (ciclo de 199 dias). Pôde-se observar que a distribuição do vírus não foi uniforme para as diferentes cultivares. Para o alho tipo branco, a maior concentração do vírus foi detectada na fase inicial do ciclo, com uma drástica queda na fase vegetativa e aumento gradual no final do ciclo. No alho tipo vermelho houve baixa concentração do vírus, com um leve aumento na fase de bulbificação e decréscimo no final do ciclo. Já para a cultivar de ciclo curto, houve um aumento na concentração no final do ciclo da cultura (CONCI et al., 2002).

Conci e colaboradores (2010) analisaram as concentrações de LYSV, OYDV e allexivirus aos 140 (fase de bulbificação) e 210 dias (final de ciclo) após o plantio. As concentrações foram maiores aos 210 dias para todos os testes. Para LYSV aos 140 dias não houve diferença na concentração viral entre as folhas analisadas, e aos 210 dias, a folha mais nova havia menor concentração que a folha mais velha. Para OYDV, aos 140 dias a folha mais nova havia maior concentração viral, e aos 210 dias a folha mais velha havia maior concentração. No caso do OYDV, os resultados estão de acordo com o realizado por Koch e Salomon (1994) que demonstraram que em folhas mais jovens, a concentração de OYDV é relativamente baixa e em folhas mais maduras apresentaram níveis crescentes de vírus até a quarta ou quinta folha abaixo do ápice.

De acordo com os trabalhos realizados por diversos autores, é possível observar que a concentração viral pode variar de acordo com as cultivares, e possivelmente as condições climáticas para o desenvolvimento da cultura podem influenciar na concentração viral. No Brasil o alho é uma cultura de ciclo mais curto, com 120 a 180 dias (Filgueira, 2007), sendo a região sul onde o alho possui ciclos mais longos, e a região do Cerrado (Goiás) com ciclo mais curto, sendo esta última onde a área plantada com o alho vem aumentando ano após ano. Com os resultados obtidos nesse trabalho foi possível determinar que para uma diagnose mais confiável, para o alho de ciclo mais curto e no caso dos potyvirus, a coleta do material deve ser feita dos 21 aos 63 dias após o plantio, dando preferência para folhas mais novas (segunda ou terceira folha abaixo do ápice) onde se verificou maior concentração viral. No caso dos bulbos, há baixa concentração de vírus, e de acordo com testes realizados anteriormente (Pavan, comunicação pessoal), foi possível verificar que a distribuição dos vírus

nos bulbos é irregular, onde nem todos os bulbilhos estão infectados pelo vírus, sendo inviável a sua utilização para detecção de vírus em alho.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste trabalho (Processo N° 2010//16148-9). Ao Eng. Agrônomo Isao Imaizumi, pelo auxílio na condução do experimento.

4. REFERENCIAS

1. Conci, V.C. 1997. An overview of *Allium* viruses in Argentina. *Acta Horticulturae* 433: 593-600.
2. Conci, V.C.; Lunello, P.; Baraschi, D. 2002. Variations of *Leek yellow stripe virus* concentration in garlic and its incidence in Argentina. *Plant Disease* 86(10):1085-1088.
3. Conci, V.C.; Canavelli, A.E.; Balzarini, M.G. 2010. The distribution of garlic viruses in leaves and bulbs during the first year of infection. *Journal of Phytopathology* 158:186-193.
4. Filgueira, F.A.R. 2007. *Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. 3 ed. Viçosa: Editora UFV 15:255-278.
5. Koch, M.; Salomon, R. 1994. Serological detection of Onion yellow dwarf virus in garlic. *Plant Disease* 78(8):785-788.
6. Lot, H.; Chovelon, V.; Souche, S.; Delecolle, B. 1998. Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yields loss of three French garlic cultivars. *Plant Disease* 82:1381-1385.
7. Maeso, C.; Pagani, C.; Conci, V.C.; Mirabelle, L. 1997. Studies on viruses affecting garlic in Uruguay. *Acta Horticulturae* 617-622.
8. Tsuneyoshi, T.; Sumi, S. 1996. Differentiation among garlic viruses in mixed infections based on RT-PCR procedures and direct tissue blotting immunoassay. *Phytopathology* 86:253-259.

CAPÍTULO 4

Título: Detection of *Leek yellow stripe virus* in garlic: sensitivity of different techniques and methods of sample preparations

Redigido de acordo com as normas da revista *Journal of Virological Methods*

Detection of *Leek yellow stripe virus* in garlic: sensitivity of different techniques and methods of sample preparations

TATIANA MITUTI^{a,b}; MARCELO AGENOR PAVAN^b; TERUO SANO^c; KAZUO YAMASHITA^a.

^aAomori Prefectural Industrial Technology Research Center, Japan. Aomori Field Crops and Horticultural Research Center; 91 Yanagisawa, Inuotose, Rokunohe, Aomori 033-0071, Japan. E-mail: kazuo_yamashita@aomori-itc.or.jp

^bFaculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP), Departamento Proteção Vegetal, Botucatu, SP, Brazil. E-mail: tatiana.mituti@gmail.com

^cHirosaki University, Faculty of Agriculture and Life. Bunkyo-cho 3, Hirosaki, Aomori 036-8561, Japan. E-mail: sano@cc.hirosaki-u.ac.jp

ABSTRACT

Leek yellow stripe virus (LYSV) cause mosaic disease in garlic, and generally can be associated with another virus of genus *Potyvirus*, *Allexivirus* and *Carlavirus*. The objective of this work was to compare different techniques to detect LYSV in garlic. There were used crude sap and purified virus particle to test with four different techniques: Colorimetric-DIBA, Chemiluminescent-DIBA, ELISA and real-time RT-PCR. Specific pair of primers were designed to detect this specie in real-time RT-PCR. The samples were serially diluted to check the end point of detection for each technique. Using virus purification, colorimetric-DIBA test gave positive reactions at dilutions from 10 µg/mL to 50 ng/mL, for chemiluminescent-DIBA positive reactions were detected at 10 µg/mL to 100 ng/mL, ELISA test gave positive at 10 µg/mL to 500 ng/mL and real time RT-PCR the dilutions at 10 µg/mL to 1 ng/mL were positive. Using crude sap, colorimetric and chemiluminescent DIBA 1,000 x dilutions were positive, for ELISA 5,000x dilutions and for real time RT-PCR 10,000x dilutions. Purified virus and crude sap can be used for detection, and the results showed that real time RT-PCR have high sensitivity comparing with other techniques.

Key-words: Real-Time RT-PCR, DIBA, ELISA.

RESUMO

Leek yellow stripe virus (LYSV) causa a doença do mosaico do alho e, geralmente, pode estar associado com outros vírus de gênero *Potyvirus*, *Allexivirus* e *Carlavirus*. O objetivo deste trabalho foi comparar diferentes técnicas para detectar LYSV em alho. Foram utilizados extrato bruto macerado e vírus purificado para testar quatro diferentes técnicas: DIBA-colorimétrico, DIBA-quimioluminescente, ELISA e PCR em tempo real. Oligonucleotídeos específicos foram desenhados para a detecção do LYSV por PCR em tempo real. As amostras foram diluídas em série para verificar a concentração mínima para detecção. Utilizando o vírus purificado, para o teste DIBA-colorimétrico foi possível observar reações positivas nas diluições de 10 µg/mL a 50 ng/mL, para o teste de quimioluminescência, as reações positivas foram detectadas a 10µg/mL à 100 ng/mL, o teste ELISA apresentou-se positivo de 10 µg/mL a 500 ng/mL e para o PCR em tempo real, as diluições de 10 µg/mL a 1ng/mL foram positivas. Utilizando extrato bruto, para os testes colorimétrico e quimioluminescente reações positivas foram observadas até a diluição de 1.000 vezes. Para ELISA, a diluição de 5.000 vezes, e para o PCR em tempo real até a diluição de 10.000 vezes. O vírus purificado e extrato bruto podem ser utilizados para a detecção, e os resultados mostraram que a PCR em tempo real tem uma sensibilidade elevada quando comparadas com as demais técnicas.

Palavras-chave: PCR em tempo real, DIBA, ELISA.

1. INTRODUCTION

Potviruses are the most frequently detected and serious viruses known to cause more severe damage in garlies (Salomon, 2002). Two potyvirus species, *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) and *Leek yellow stripe virus* (LYSV) (Chen *et al.*, 2001; Klukackova *et al.*, 2007; Maeso *et al.*, 1997;), have been reported widely in the South and Southeast Asian countries (Barg *et al.*, 1994), Italy (Bellardi *et al.*, 1995), Venezuela (Marys *et al.*, 1994), France (Messiaen, 1994), Japan (Takaichi *et al.*, 1998), China (Chen *et al.*, 2001) and Brazil (Daniels, 1999; Dusi, *et al.*, 1994; Fajardo *et al.*, 2001).

LYSV belongs to the genus *Potyvirus* (Family *Potyviridae*), with a single strand, positive sense RNA genome of approximately 10.297 nucleotides in length. LYSV was first detected in leek plants in 1970, with 40% of detection frequency in Belgium (Verhoyen *et al.*, 1973). LYSV also infects garlic showing yellow stripes in leaves (Takaki *et al.*, 2005), and can cause severe losses in yields and quality due to the smaller and mal formed bulbs.

ELISA diagnostic kits are available commercially, however, by the progress in gene diagnosis techniques based on reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR), the pathogen can be now detected more easily and specifically. To establish more accurate and specific diagnosis technique for the major garlic viruses, here we developed real-time RT-PCR primers for LYSV, and compared the sensitivity to the conventional techniques, such as ELISA, colorimetric-DIBA, and chemiluminescent-DIBA.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Primer design

Based on the genome sequences of LYSV (accession numbers AB194623, AB194622, AB194621), six pairs of primers were designed from the regions coding cylindrical inclusion (CI), nuclear inclusion b (NIb) and coat protein (CP) using the program Primer 3 (Genotype Vers.11) and DNASIS Pro (Hitachi).

2.2. Samples preparation

2.2.1. Virus purification

One hundred grams of garlic leaves were homogenized with five volumes (w/v) 0.5M phosphate buffer pH 8.5 containing 0.5M urea and 0.2% thioglycolic acid. The homogenate was filtered through cheesecloth and the filtrate centrifuged at 7,000xg for 10 minutes, and 2% of Triton X-100 was added to the supernatant and it was agitated for 30 minutes at room temperature. The suspension was centrifuged at 100,000 g for 90 minutes and the pellet was resuspended in 1 volume of 0.05M phosphate buffer pH 8.5 containing 0.5M urea, agitated for 60 minutes at 4 °C, and centrifuged for 2 minutes at 7,000xg. The supernatant was centrifuged 100,000 g for 90 minutes and the pellet was resuspended in 6 mL of 0.05M phosphate buffer, and layered over a 0-40% CsCl₄ containing 20% sucrose in 0.5M phosphate buffer. The gradient was ultracentrifuged at 38,000 rpm for 150 minutes. The virus band was extracted with syringe and ultracentrifuged at 100,000 g for 90 minutes, and the pellet was resuspended in 200 µl of 0.05M phosphate buffer. The purified virus was quantified and analyzed in the electron microscopy.

2.2.2. Crude sap and total RNA extraction

Garlic leaves (0.1g) were homogenized with 1 mL of four different buffers: TE (Tris-EDTA), 0.05M phosphate buffer pH 7.5, 0.05M borate buffer pH 8.5, 0.1M Tris pH 8.0 and DEPC water.

Total RNA was extracted from garlic leaf, using Plant total RNA Mini Kit (Favorgen Biotech Corp), according to manufacturer's instruction.

2.3. Real time RT-PCR

The reaction was performed using Takara PS Plus RT-PCR One Step SYBR Green Kit. A total 12.5 µl of the reaction mixture contains 6.25 µL of 2X Buffer, 0.25

μ L RTase, 0.75 μ L EX Taq HS Mix, 20 pmol each of primers, 1 μ L of sample and Nuclease Free Water. Annealing temperatures of the primers were determined by temperature gradient PCR. The sequential reaction is consisted of reverse transcription for 10 minutes at 42 °C, denaturation for 55 seconds at 95 °C, and 35 cycles of amplification at 95 °C for 5 seconds and 61 °C for 30 seconds.

2.4. Dot Immunobinding Assay (DIBA) using chemiluminescent protein detection

Five μ l of each sample was applied in Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (BioRad). The membrane was immersed in a solution of 2% Triton X-100 for 15 minutes, and then blocked using 2% BSA in Tris-buffered saline (TBS) with 1% Triton for 15 minutes, and then incubated for 20 minutes in LYSV antibody (Peptide of N-terminal region of CP) (1:1000). After incubation, the membrane was washed twice with TTBS buffer for 7 minutes. The membrane was incubated in anti-rabbit IgG alkaline phosphatase antibody (Sigma) for 20 minutes, and washed twice in TTBS buffer. The substrate used was Immun-Star AP GOAT Anti-Rabbit IgG (H+L) Detection Kit (BioRad), and the membrane was analyzed at ChemiDoc MP (BioRad).

2.5. DIBA using colorimetric protein detection

Except for nitrocellulose membrane (0.2 μ m, BioRad), the protocol was the same to chemiluminescent protein detection. NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) was used as substrate.

2.6. Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)

One hundred μ l of the sample was applied in a polypropylene plate and incubated for 2 hours at 37 °C. The plate was washed for three times with PBS-Tween, and then LYSV antibody (Peptide of N-terminal region of CP) (1:1000) was incubated for 1 hour at 37 °C. After this step, the plate was washed for three times with PBS-Tween and added Anti-rabbit IgG Alkaline Phosphatase antibody (Sigma), incubated for 1 hour and

washed with PBS-Tween. The substrate used was p-nitrophenyl phosphate (1 mg/mL). After incubation for 60 minutes, the color development was measured using Microplate Reader BioRad 3550 at the absorbance wave length of 405nm.

2.7. Dilutions of samples

For each test, samples were serially diluted by 10-folded to compare the detection end point of the assays. For the total RNA preparation, samples were diluted at concentrations of 10 μ g/mL, 1 μ g/mL, 100 ng/mL, 10 ng/mL, 1 ng/mL, 100 pg/mL, 10 pg/mL, 1 pg/mL, 100 fg/mL and 10fg/mL. For the purified virus preparation, concentrations were from 10 μ g to 1pg/mL, which were then used for real-time RT-PCR and DIBA using colorimetric and chemiluminescent protocols. For ELISA the dilution test was performed at 10 μ g-1ng/mL. For crude sap preparation, the dilutions started from 10 to100,000-fold for real-time RT-PCR, and 10 to10,000-fold for DIBA and ELISA.

3. RESULTS

3.1. Selection of real time RT-PCR primers and buffers for nucleic acids preparation

For the real time RT-PCR assay of LYSV, we have first examined the primers using the purified virus and crude sap. As the result, among the six pairs of primers examined, the primer pair, LYS_F 9802 (5'-CATTTAAAAAGTCCCGAGTG-3') and LYS_R9963 (5'- ACCTCAAACCAAGTGTTGAC-3'), extracted from CP coding region, gave the best amplification. The amplicon size was 160 bp and the best annealing temperature was 61 °C. The dissociation curve is showed in figure 1. Then, extraction/dilution buffers were examined. Namely, LYSV-infected garlic leaf samples were homogenized in four kinds of extraction buffers, and used for real-time RT-PCR assay. The result showed that 0.05M phosphate buffer gave the best amplification without causing noticeable non specific reaction.

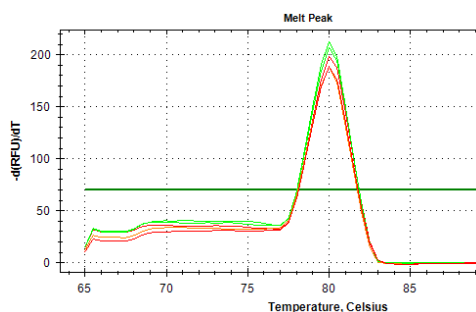


Figure 1. Dissociation curve (melt) realized for LYSV.

3.2. Comparison of ELISA, DIBA and Real Time RT-PCR using purified virus

Colorimetric-DIBA test gave positive reactions at dilutions of 10 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 500 ng/mL , 100 ng/mL and 50 ng/mL (Figure 2A). Chemiluminescent-DIBA gave positives at 10 $\mu\text{g/mL}$ to 100 ng/mL (Figure 2B). ELISA test gave positive at 10 $\mu\text{g/mL}$ to 500 ng/mL (Figure 3A). Real time RT-PCR the dilutions of 10 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 500 ng/mL , 100 ng/mL , 50 ng/mL , 10 ng/mL , 5 ng/mL and 1 ng/mL (Figure 3B). In summary, the detection end point was 50 ng/mL for colorimetric-DIBA, 100 ng/mL for chemiluminescent-DIBA, 500 ng/mL for ELISA, and 1 ng/mL for real time RT-PCR, showing that real time RT-PCR was 50 – 500 times sensitive than the other methods.

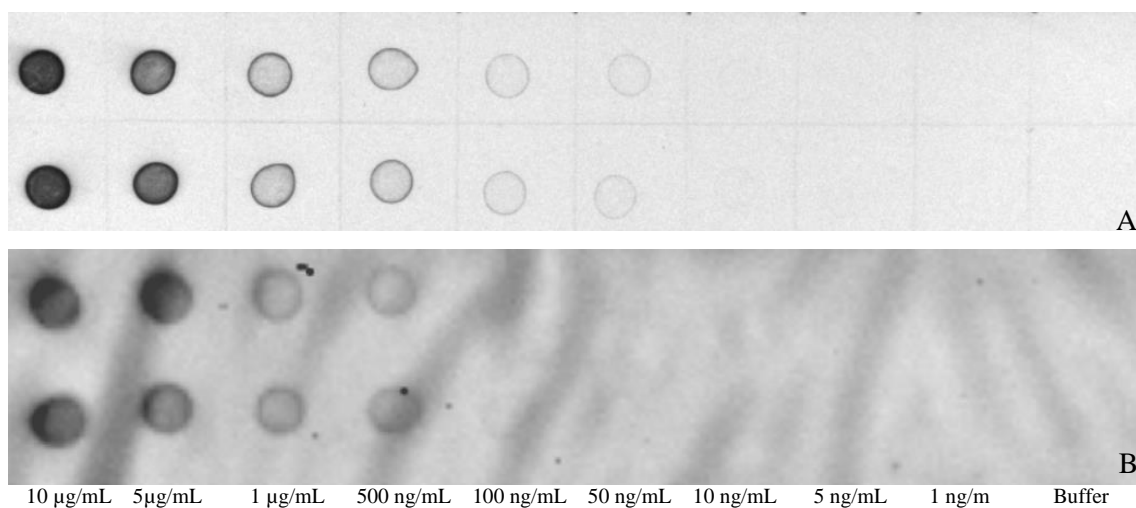


Figure 2. (A) Colorimetric DIBA test; (B) Chemiluminescent test. Both of tests were used purified virus in a dilution of 10 $\mu\text{g/mL}$ to 1 ng/mL .

A

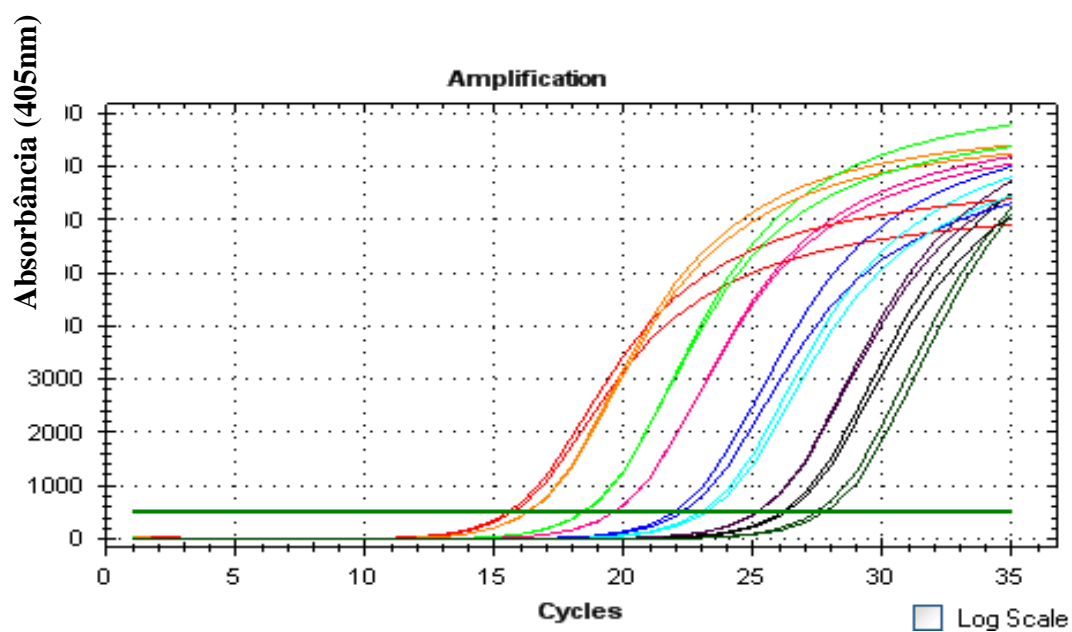
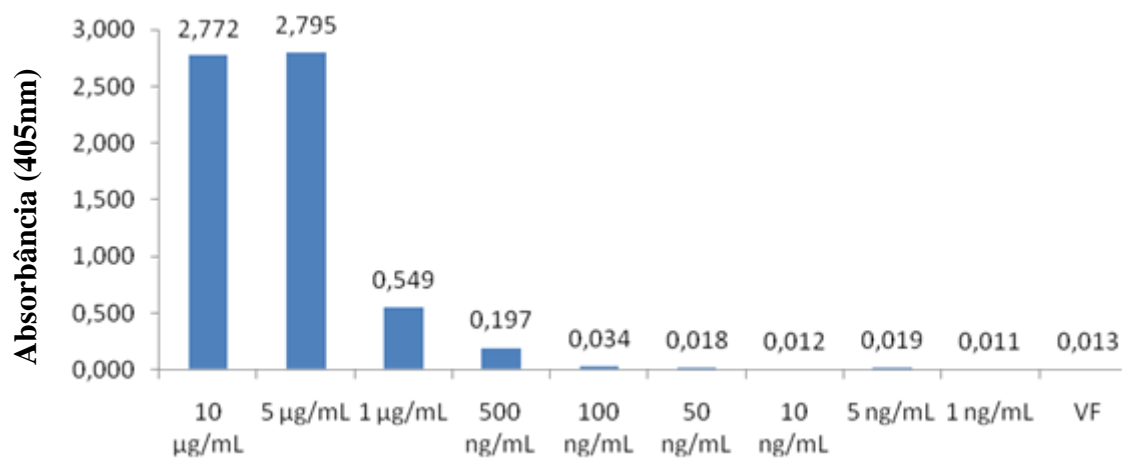


Figure 3. (A) ELISA test with purified virus in a dilution of 10µg/mL to 1 ng/mL. (VF= virus free garlic leave used as negative control). (B) Real time RT-PCR with dilutions of purified virus in a dilution of 10µg/mL to 1 ng/mL. Each color corresponds to one dilution.

3.3. Comparison of ELISA, DIBA and Real time RT-PCR using crude sap

In colorimetric (Figure 4A) and chemiluminescent DIBA test (Figure 4B), positive reactions were obtained down to 1,000x dilutions. In ELISA test, positive were obtained at 5,000x dilution (Figure 5A). Real time RT-PCR was again the most sensitive and positive reactions were obtained to 10,000x dilutions (Figure 5B). Furthermore, when we used purified LYSV-RNA as standard, it was possible to estimate the concentrations of LYSV in crude sap by real time RT-PCR; i.e., the estimated concentration of LYSV in our crude sap preparations were 5 – 100 $\mu\text{g/mL}$ (Table 1).

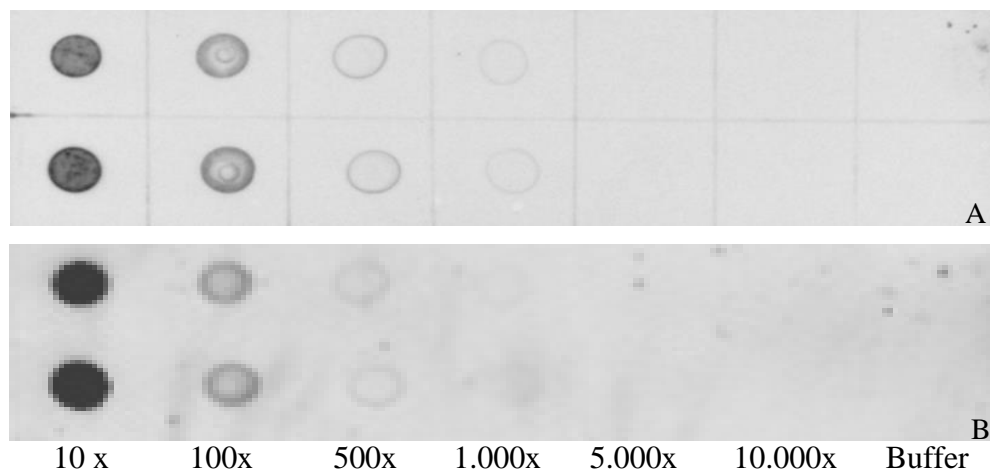


Figure 4. (A) Colorimetric DIBA test; (B) Chemiluminescent DIBA test. Both of tests were used crude sap in a dilution of 10x to 10,000x.

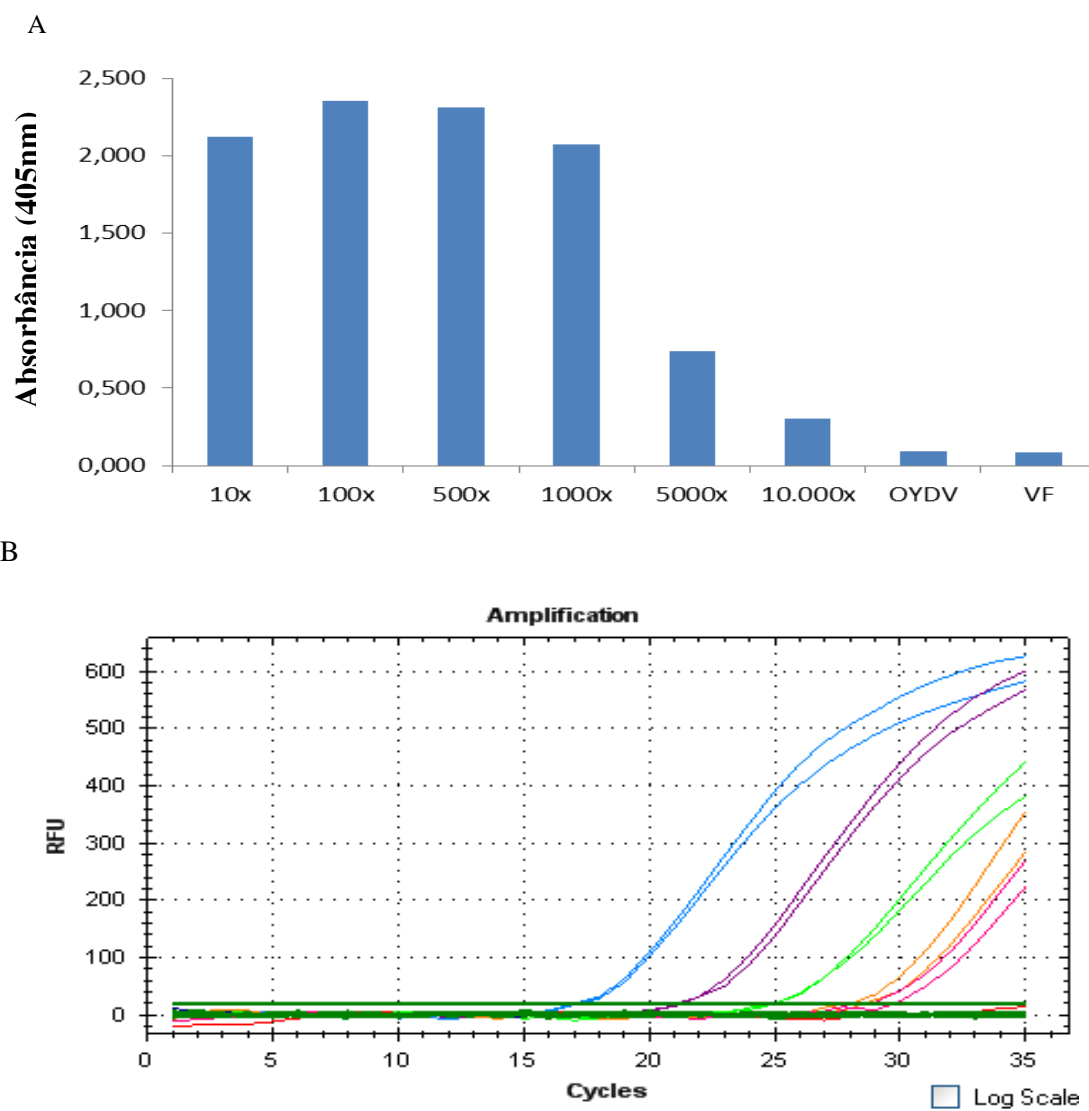


Figure 5. (A) ELISA test with crude sap in a dilution of 10x to 10,000x (OYDV= *Onion yellow dwarf virus* and VF= virus free garlic leaf used as negative control). (B) Real Time RT-PCR with crude sap, with the dilutions of 10x to 500,000x.

Table 1. Dilutions with crude sap used for real time RT-PCR, and the estimated concentration of each sample, based in purified LYSV-RNA dilutions used as standard curve.

Purified LYSV-RNA		Crude sap		
Concentration	Ct	Dilution	Ct	Estimated concentration of samples
10 µg/mL	15	10x	N/A	-
1 µg/mL	19	100x	17	5 µg/mL
100 ng/mL	22	500x	21	100 ng/mL
10 ng/mL	25	1.000x	24	10 ng/mL
1 ng/mL	27	5.000x	28	100 pg/mL
100 pg/mL	28	10.000x	29	10 pg/mL
10 pg/mL	29	50.000x	N/A	-
1 pg/mL	30	100.000x	N/A	-
100 fg/mL	31	500.000x	N/A	-
10 fg/mL	32			

Ct = Cycle Threshold (amplification); N/A = no amplification

4. DISCUSSION

Real time RT-PCR protocols were developed and optimized for the sensitive detection of LYSV in garlic. By comparative analysis with the conventional virus detection protocols, the real time RT-PCR with purified virus preparation proved to be 500 times, 100 times and 50 times more sensitive than ELISA, chemiluminescent-DIBA, and colorimetric-DIBA, respectively. Similarly, with crude sap preparation, the real time RT-PCR was 10 times more sensitive than chemiluminescent- and colorimetric-DIBA.

In the previous reports using duplex RT-PCR protocol for two garlic viruses, OYDV and SLV, duplex RT-PCR was shown to be about 10^2 - 10^4 times more sensitive than ELISA (Dovas et al, 2001). In case of real time RT-PCR using TaqMan® for *Beet necrotic yellow vein virus*, the result was somewhat unstable but the real time RT-PCR

protocol was 100 times more sensitive than ELISA, however, the dilution end point was almost the same with each other in some cases (Harjuet al., 2005). These results are in agreement with our present work. In comparison, a protocol combining Immuno-Capture RT-PCR and TaqMan® RT-PCR developed for two garlic potyviruses, OYDV and LYSV, showed extremely higher increase of sensibility; i.e., the sensitivity increased 10^6 -fold comparing to ELISA (Lunello et al., 2004).

According to Hibi and Saito (1985), DIBA in general is more sensitive than ELISA and can be completed within a shorter time. Our present analysis on the comparison of DIBA and ELISA, using purified virus, also showed that DIBA was 10 times more sensitive than ELISA. On the contrary, in the protocol developed for the detection of *Banana bunchy top virus*, in one of the tests, DIBA was two-fold less sensitive than ELISA and DIBA-ECL (using luminol and hydrogen peroxidase as substrate) (Geering and Thomas, 1996). In the report on Closterovirus detection by DIBA, chemiluminescent detection was more sensitive than colorimetric detection using NBT/BCIP (Pollini et al., 1993), however, the result was reverse in our protocol. These inconsistencies may be dependent on the quality of virus anti-body, specificity of PCR primers and/or the characters of viruses and hosts, but anyway, it can be stress that real time RT-PCR can be one the most sensitive detection method to detect garlic viruses such as LYSV.

When we used crude sap for ELISA, the positive reaction in 10x dilution was lower than that in 100x. It was also the case in real time RT-PCR, in which no positive amplification was obtained from 10x diluted crude sap; i.e., the most concentrated sample. It is apparent that higher amounts of inhibitors contained in garlic leaves inhibited the amplification. Those host components, e.g. polysaccharide in garlic extracts, can bind and aggregate with a lot of virus particles during incubation periods. Therefore, successful elimination of these inhibitory components will further improve the sensitivity.

ACKNOWLEDGEMENTS

CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, for financial support (Capes/PDSE Process number 5279/11-9)

5. REFERENCES

1. Barg, E.; Lesemann, D.E.; Vetten, H.J. 1994. Identification, partial characterization, and distribution of viruses infecting allium crops in South and Southeast Asia. *Acta Horticulturae* 358:251-258.
2. Bellardi, M.G.; Marani, F.; Betti, L.; Rabiti, A.L. 1995. Detection of *Garlic common latent virus* (GCLV) in *Allium sativum* L. in Italy. *Phytopathology* 34:58-61.
3. Chen, J.; Chen, J.; Adams, M.J. 2001. Molecular characterization of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. *Archives of Virology* 146:1841-1853.
4. Daniels, J. 1999. Occurrence of virus in garlic in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 24:91.
5. Dovas, C.I.; Hatziloukas, E.; Salomon, R.; Shibolet, Y.; Katis, N.I. 2001. Incidence of viruses infecting *Alliums* spp. in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 107:677-684.
6. Dusi, A.N.; Fajardo, T.V.M.; Cupertino, F.P. 1994. Serological identification of garlic (*Allium sativum* L.) viruses in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 19:298.
7. Fajardo, T. V. M.; Nishijima, M.; Buso, J. A.; Torres, A. C.; Avila, A. C.; Resende, R. O. 2001. Garlic viral complex: identification of potyviruses and carlaviruses in Central Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 26(3):619-626.
8. Geering, A.D.W.; Thomas, J.E. 1996. A comparison of four serological tests for the detection of banana bunchy top virus in banana. *Australian Journal of Agricultural Research* 47(3):403-412.
9. Harju, V.A.; Skelton, A.; Clover, G.R.G.; Ratti, C.; Boonham, N.; Henry, C.M.; Mumford, R.A. 2005. The use of real-time RT-PCR (TaqMan®) and post-ELISA virus release for the detection of *Beet necrotic yellow vein virus* types containing RNA 5 and its comparison with conventional RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 123:73-80.
10. Hibi, T.; Saito, Y. 1985. A dot immunobinding assay for the detection of Tobacco mosaic virus in infected tissues. *Journal of General Virology* 66:1191-1194.
11. Klukackova, J.; Navratil, M.; Duchoslav, M. 2007. Natural infection of garlic (*Allium*

- sativum* L.) by viruses in the Czech Republic. *Journal of Plant Diseases and Protection* 3(4):97-100.
12. Lunello, P.; Mansilla, C.; Conci, V.; Ponz, F. 2004. Ultra-sensitive detection of two garlic potyvirus using real-time fluorescent (Taqman[®]) RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods* 118:15-21.
 13. Maeso, C.; Pagani, C.; Conci, V.C.; Mirabelle, L. 1997. Studies on viruses affecting garlic in Uruguay. *Acta Horticulturae* 433:617-622.
 14. Marys, E.; Carballo, O.; Izaguirre-Mayoral, M.L. 1994. Isolation and characterization of viruses present in four clones of garlic (*Allium sativum*) in Venezuela. *Journal of Phytopathology* 142:227-234.
 15. Messiaen, C.M. 1994. Thirty years of France experience in production of disease-free garlic and shallot mother bulbs. *Acta Horticulturae* 358:275-279.
 16. Pollini, C. P., Giunchedi, L., AND Credi, R. 1993. A chemiluminescent immunoassay for the diagnosis of grapevine closteroviruses on nitrocellulose membrane. *Journal of Virological Methods* 42(1):107-116.
 17. Salomon, R. Virus Diseases in Garlic and the propagation of virus-free plants. 2002. In: Rabinowitch, H. D.; Currah, L. (Eds.) *Allium Crop Science: Recent Advances*. New York: CABI 13:311-327.
 18. Takaichi, M.; Yamamoto, M.; Nagakubo, T.; Oeda, K. 1998. Four garlic viruses identified by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction and their regional distribution in Northern Japan. *Plant Disease* 82(6):694-698.
 19. Takaki, F.; Sano, T.; Yamashita, K.; Fujita, T.; Ueda, K.; Kato, T. 2005. Complete nucleotide sequences of attenuated and severe isolates of Leek yellow stripe virus from garlic in northern Japan: identification of three distinct virus types in garlic and leek world-wide. *Archives of Virology* 150(6):1135-1149.
 20. Verhoyen, M.; Horvat, F.L. 1973. La striure chlorotique du porreau. Identificatin de l'agent causal. *Parasitica* 29:16.

CAPÍTULO 5

Título: Distribuição e concentração do *Leek yellow stripe virus* em folhas de alho em diferentes estágios de desenvolvimento. Distribution and concentration of *Leek yellow stripe virus* on garlic leaves in different stages of development.

Redigido de acordo com as normas da revista *Tropical Plant Pathology*

Distribution and concentration of *Leek yellow stripe virus* on garlic leaves in different stages of development.

Tatiana Mituti^{1,2}; Renate Krause Sakate²; Marcelo Agenor Pavan²; Teruo Sano³; Kazuo Yamashita¹.

¹Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center, Japan. Aomori Field Crops and Horticultural Research Center; 91 Yanagisawa, Inuotose, Rokunohe, Aomori 033-0071, Japan.

E-mail: kazuoyamashita@aomori-itc.or.jp. ²Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP), Departamento Proteção Vegetal, Botucatu, SP, Brazil. ³Hirosaki University, Faculty of Agriculture and Life. Bunkyo-cho 3, Hirosaki, Aomori 036-8561, Japan.

ABSTRACT

Leek yellow stripe virus may cause damage in garlic. This species belongs to genus *Potyvirus* with a single strand RNA, positive sense. To make an accurate diagnosis in garlic plants, the objective of this work was to verify the distribution of LYSV at 5, 8, 14 and 21 days after inoculation (d.a.i.) and identify the part of the leaf with the highest concentration by ELISA test, colorimetric and chemiluminescent DIBA and qRT-PCR. At 21 d.a.i. the virus was detected by all tests used. Colorimetric and chemiluminescent DIBA could detect the virus at 14 days. With the qRT-PCR to 5 or 8 days after inoculation using the first or second leaf, and at 14 and 21 days after the inoculation, the younger leaves are the most suitable for analysis due to higher concentrations of the virus.

Keywords: Real time RT-PCR, colorimetric and chemiluminescent DIBA, ELISA

RESUMO

Leek yellow stripe virus pode causar danos em plantas de alho. Esta espécie pertence ao gênero *Potyvirus* que é constituído de um RNA de fita simples, sentido positivo. Para fazer um diagnóstico preciso em plantas de alho, o trabalho teve como objetivo verificar a distribuição de LYSV 5, 8, 14 e 21 dias após a inoculação, e identificar a parte da folha com maior concentração através do teste de ELISA, DIBA colorimétrico, DIBA quimioluminescente, e qRT-PCR. Aos 21 dias foi possível fazer a detecção com todos os testes utilizados. Utilizando DIBA colorimétrico e quimioluminescente foi possível detectar o vírus aos 14 dias. Com o qRT-PCR aos 5 ou 8 dias após a inoculação, utilizando a extremidade da primeira ou segunda folha, e aos 14 e 21 dias após a inoculação, as folhas mais jovens são as mais indicadas para a análise, devido às concentrações mais elevadas.

Palavras-chaves: PCR em tempo real; DIBA colorimétrico e quimioluminescente; ELISA

1. INTRODUCTION

Potyvirus species are easily detected on garlic plants and is the one that have caused more damage in garlic (Salomon, 2002). This genus has a single strand RNA (ssRNA), with positive sense and approximately 10.297 nucleotides in length (King et al., 2012).

There are two important species in this genus: *Leek yellow stripe virus* (LYSV) and *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) (Maeso et al., 1997; Chen et al., 2001; Klukackova et al., 2007), related in Asia (Barg et al., 1994), Italy (Bellardi et al., 1995), Venezuela (Marys et al., 1994), France (Messiaen, 1994), Japan (Takaichi et al., 1998) and also in Brazil (Dusi, et al., 1994). LYSV can cause severe symptoms of mosaic, streak on leaves, stunting of the plant and great reduction of bulb weight (Lot et al., 1998; Bai et al., 2010).

According to the work carried out by some authors, it is possible to observe that the viral concentration and localization may vary according to the cultivar, and possibly climate conditions for the development of culture may influence the viral concentration.

An accurate diagnosis of a plant virus depends on the title of the virus in the tissue analyzed and its distribution in the plant (Conci et al., 2010).

The objective of this work was to analyze the distribution of a severe strain of LYSV in garlic leaves after 5, 8, 14 and 21 days after inoculation, using different techniques and identify the part of the leaf with the highest concentration of the virus.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Inoculation of plants and sample preparation

Fourteen cloves from virus-free garlic were planted, and after 25 days from planting, two-leaf stages of the plant were inoculated with a severe strain of LYSV (isolate LYIAII from Aomori, Japan). Infected leaves were grinded in a mortar with 0,05M potassium phosphate pH 7,5 and Carborundum 600 as abrasive. After 5, 8, 14 and 21 days after inoculation (d.a.i.) garlic plants were collected for analysis. All leaves of the plant were analyzed and each leaf was divided into three parts (tip, middle and base) for analysis of the presence of virus using crude sap and total RNA, according to figure 1. Crude sap was prepared using 0,05g of garlic leaf and homogenized with 1 mL of 0,05M phosphate buffer, and diluted 1:100 (w/v). Total RNA was extracted using Plant total RNA Mini Kit (Favorgen Biotech Corp).

This experiment was performed at Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center (Aomori-Shi, Rokunohe-machi, Japan).

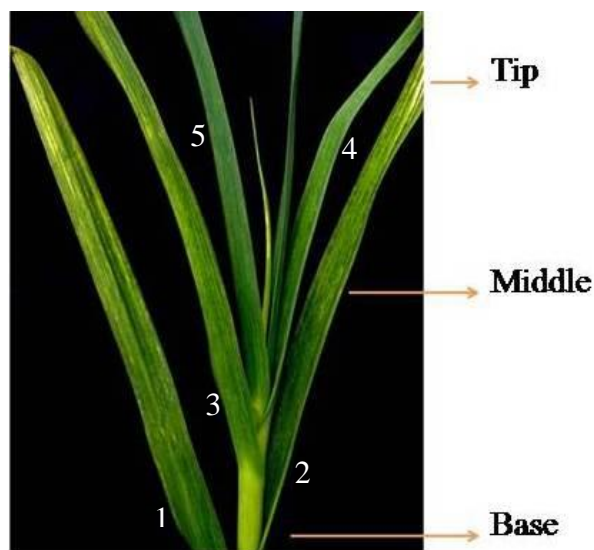


Figure 1 – Parts of garlic leaves analyzed, divided into three parts (tip, middle and base); and number of each leaf analyzed.

2.2. Techniques of analysis

2.2.1. Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)

A hundred microliter of the sample was applied in a polypropylene plate and incubated for 2 hours at 37 °C. The plate was washed for three times with PBS-Tween, and then the LYSV IgG (1:100) was incubated for 1 hour at 37 °C. After this step, the plate was washed for three times with PBS-Tween and then added Anti-rabbit IgG alkaline phosphatase antibody (Sigma), incubated for 1 hour and washed with PBS-Tween. The substrate used was p-nitrophenyl phosphate (1 mg/mL). After 60 minutes the analyses were performed using Microplate Reader BioRad 3550 at the absorbance wave length of 405nm.

2.2.2. Dot Immunobinding Assay (DIBA) using chemiluminescent and colorimetric protein detection

For DIBA using chemiluminescent and colorimetric protein detection, five microliters of each sample was applied in Polyvinylidene difluoride (PVDF) and Nitrocellulose membrane 0,2 µm from BioRad, respectively. The membrane was immersed in a solution of 2% Triton X-100 for 15 minutes, and then blocked using 2% BSA in TTBS for 15 minutes, and then incubated for 20 minutes in LYSV IgG (1:100). After incubation, the membrane was washed twice with TTBS buffer for 7 minutes. After washing, the membrane was incubated in Anti-rabbit IgG Alkaline Phosphatase antibody (Sigma) for 20 minutes, and washed twice in TTBS buffer. The substrate used for chemiluminescent detection was Immun-Star AP GOAT Anti-Rabbit IgG (H+L) Detection Kit (BioRad), and the membrane was analyzed at ChemiDoc MP (BioRad). For colorimetric detection the substrate used was NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate).

2.3.3. Real Time RT-PCR

The reaction was performed using Takara PS Plus RT-PCR One Step SYBR Green Kit. The reaction was performed in a volume of 12,5 µl, using 6,25 µL of 2X Buffer, 0,25 µL RTase, 0,75 µL EX Taq HS Mix, 20 pMol of each primer LYS_F 9802 (5` CATTTAAAAAGTCCCGAGTG 3`) and LYS_R9963 (5` ACCTCAAACCAAGTGTTGAC 3`), 1 µL of sample and Nuclease Free Water. The cycle consisted of 10 minutes at 42 °C, 55 seconds at 95 °C, 35 cycles of 95 °C/5 seconds and 61 °C/30 seconds. The primer pair used

amplifies the partial coat protein (CP) sequence producing an amplicon size of 160 bp. Virus purification was diluted in a concentration of 10 μ g/mL to 1 ng/mL and used as standard.

3. RESULTS AND DISCUSSION

With the ELISA test, the virus could be successfully detected at 21 d.a.i. on the base of second, fourth and fifth leaves stages. Before 21 d.a.i. the test is not able to detect the virus (Figure 2).

For colorimetric and chemiluminescent DIBA, it was possible to detect positive reaction in almost all leaves collected on 14 and 21 d.a.i. (Table 1), showing that these two techniques are more sensitive than ELISA test.

Using a more sensitive test as qRT-PCR, the virus could be detected at 5 d.a.i. and the highest concentration could be observed at 21 d.a.i. (Figure 3). Using crude sap (Figure 3A) and total RNA (Figure 3B) from garlic leaves, the results were equivalent, but the sensibility of the test was higher using total RNA as observed by the numbers of Ct value (Table 2). Using total RNA the virus could be detected with greater sensitivity on the tip of fifth leaf (Ct value 8) and the estimated virus concentration was upper to 10 μ g/mL (Table 2).

Table 2 compared the sample with the highest concentration of each collection date and between crude sap and RNA, showing the difference of Ct values. With total RNA the reaction was detected with the greatest sensitivity. On the tip of fifth leaf the Ct value was about 8. With crude sap, the reaction started at Ct value 10.

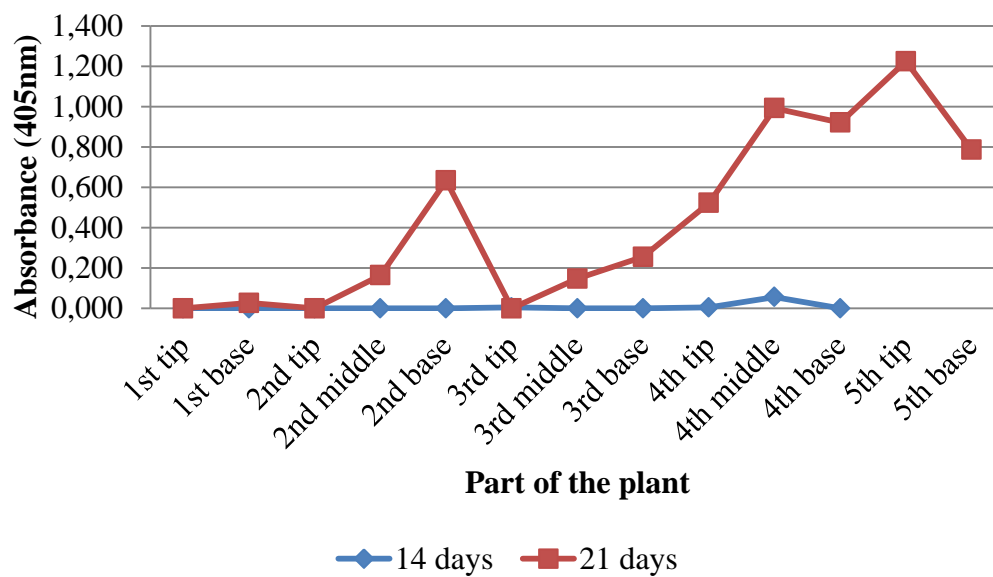


Figure 2 – Detection of LYSV in garlic plants by ELISA test. Absorbance measured at 405 nm.

Table 1 – Results from colorimetric and chemiluminescent DIBA test with 14 and 21 days after inoculation

Position of leaf	14 days		21 days	
	DIBA	Chemi	DIBA	Chemi
First tip	+	+	-	-
First base	-	-	+	-
Second tip	+	+	+	-
Second middle	++	++	+	+
Second base	+	-	+	+
Third tip	+	+	+	+
Third middle	+	+	++	+
Third base	++	+	++	++
Fourth tip	++	++	+	+
Fourth middle	++	++	++	+
Fourth base	+	+	++	+
Fifth tip	x	x	++	++
Fifth base	x	x	+	+

++ indicates the highest positive reaction; "X" indicates part of leaf that was not analyzed

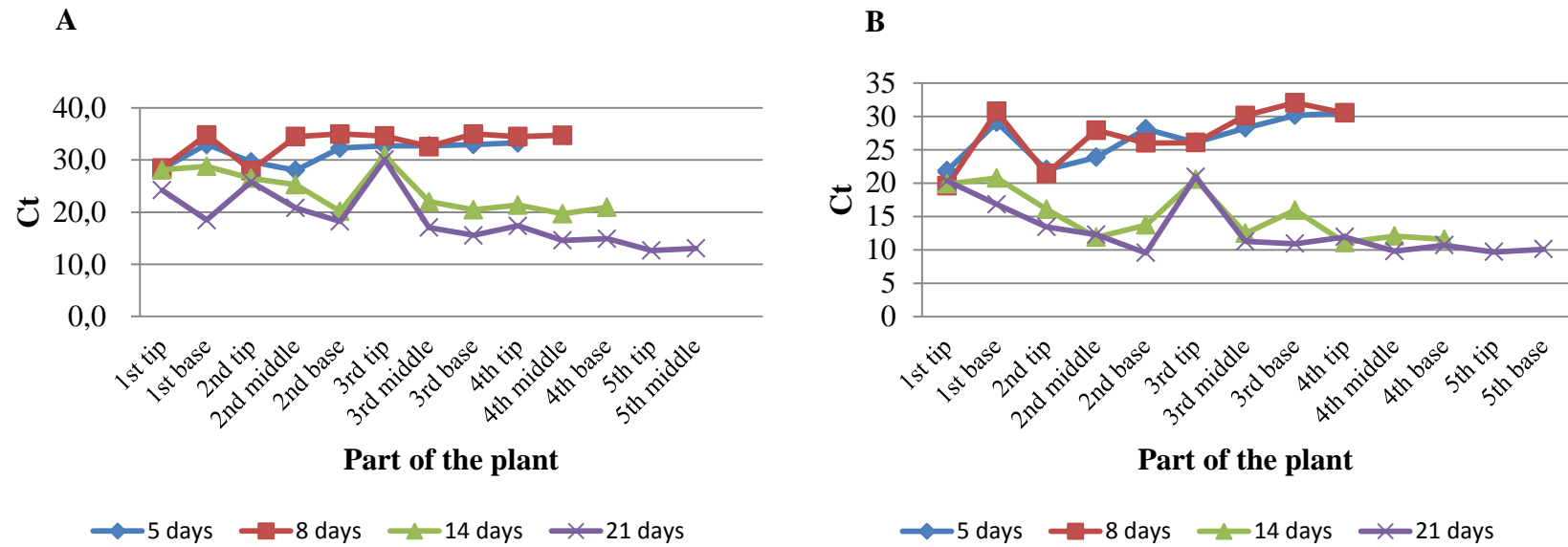


Figure 3 – Concentration of LYSV in garlic plants, analyzed by real time RT-PCR with crude sap (A); and with total RNA (B). Ct = Cycle Threshold (cycle of amplification)

Table 2 – Virus concentration in garlic leaves using crude sap and total RNA. The collection date and number of copies of the virus per microliter was estimated using the formula: $\text{Copy}/\mu\text{L} = (A/B) \times C$. A = Concentration (ng); B = 330 x length of fragment (bp); C = $6,02 \times 10^{14}$ (Takara Bioview - https://www.takara-bio.co.jp/goods/bioview/pdfs/45_41-44.pdf)

Days after inoculation	Sap			RNA		
	Ct	Estimated concentration	N. copies	Ct	Estimated concentration	N. copies
5 days	27	1ng/mL	$1,13 \times 10^{10}$	21	100 ng/mL	$1,13 \times 10^{12}$
8 days	26	5ng/mL	$5,66 \times 10^{10}$	21	100 ng/mL	$1,13 \times 10^{12}$
14 days	15	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$1,13 \times 10^{14}$	11	>10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$>1,13 \times 10^{14}$
21 days	10	>10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$>1,13 \times 10^{14}$	8	>10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$>1,13 \times 10^{14}$

5 days = first leaf (tip); 8 days = first leaf (tip); 14 days = fourth leaf (tip); 21 days = fifth leaf (tip); Ct = Cycle Threshold (Cycle of amplification).

Interaction between host and viral species, host defense system and environment, and several other factors can cause irregular distribution of virus in the leaves (Dovas et al., 2002). Conci et al (2010) observed with ELISA test, that the distribution of LYSV at 20 d.a.i was irregular. The highest concentration was in the youngest and oldest leaves. Dovas et al (2002) also detected virus in the oldest leaves, but with lower concentration, and the highest concentration was observed in the tips of youngest leaves, which is in agreement with our results.

The sensibility to detect the virus depends on the technique used, and according to several studies, real time RT-PCR is 10^2 to 10^6 -fold more sensitive than ELISA

(Harju et al., 2005; Lunello et al., 2004). DIBA test in general is more sensitive and faster than ELISA (Hibi and Saito, 1985).

Excluding ELISA test, in 14 d.a.i. (39 days after planting) it was possible to detect LYSV by different tests. The most sensitive test was real time RT-PCR, but it is also the most expensive. According to the data obtained, youngest leaves are better to do the analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, for financial support (Capes/PDSE Process number 5279/11-9)

4. REFERENCES

1. Bai Y, Zhang W, Li X, Shen Y, Gao Y, Fan G, Geng H, Meng X (2010) Advances in research of garlic virus diseases. *Journal of Northeast Agricultural University* 17(2):85-92.
2. Barg E, Lesemann DE, Vetten HJ (1994) Identification, partial characterization, and distribution of viruses infecting allium crops in South and Southeast Asia. *Acta Horticulturae* 358:251-258.
3. Bellardi MG, Marani F, Betti L, Rabiti AL (1995) Detection of *Garlic common latent virus* (GCLV) in *Allium sativum* L. in Italy. *Phytopathology* 34:58-61.
4. Chen J, Chen J, Adams MJ (2001) Molecular characterization of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. *Archives of Virology* 146:1841-1853.
5. Conci VC, Canavelli AE, Balzarini MG (2010) The distribution of garlic viruses in leaves and bulbs during the first year of infection. *Journal of Phytopathology* 158:186-193.
6. Dovas CI, Mamolos AP, Katis NI (2002) Fluctuations in concentration of two potyviruses in garlic during the growing period and sampling conditions for reliable detection by

- ELISA. *Annals of Applied Biology* 140(1): 21-28.
7. Dusi NA, Fajardo TVM, Cupertino FP (1994) Serological identification of garlic (*Allium sativum* L.) viruses in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 19:298.
 8. Harju VA, Skelton A, Clover GRG, Ratti C, Boonham N, Henry CM, Mumford RA (2005) The use of real-time RT-PCR (TaqMan®) and post-ELISA virus release for the detection of *Beet necrotic yellow vein virus* types containing RNA 5 and its comparison with conventional RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 123:73-80.
 9. Hibi T, Saito Y (1985) A dot immunobinding assay for the detection of Tobacco mosaic virus in infected tissues. *Journal of General Virology* 66:1191-1194.
 10. King AMQ, Lefkowitz E, Adams JM, Carstens EB (2012) *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. United States of America. Elsevier Academic Press.
 11. Klukackova J, Navratil M, Duchoslav M (2007) Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic. *Journal of Plant Diseases and Protection* 3(4):97-100.
 12. Lot H, Chovelon V, Souche S, Delecolle B (1998) Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yields loss of three French garlic cultivars. *Plant Disease* 82:1381-1385.
 13. Lunello P, Mansilla C, Conci V, Ponz F (2004) Ultra-sensitive detection of two garlic potyvirus using real-time fluorescent (Taqman®) RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods* 118:15-21.
 14. Maeso C, Pagani C, Conci VC, Mirabelle L (1997) Studies on viruses affecting garlic in Uruguay. *ActaHorticulturae* 433:617-622.
 15. Marys E, Carballo O, Izaguirre-Mayoral ML (1994) Isolation and characterization of viruses present in four clones of garlic (*Allium sativum*) in Venezuela. *Journal of Phytopathology* 142:227-234.
 16. Messiaen CM (1994) Thirty years of France experience in production of disease-free garlic and shallot mother bulbs. *ActaHorticulturae* 358:275-279.
 17. Salomon R (2002) Virus Diseases in Garlic and the propagation of virus-free plants.. In: Rabinowitch, H. D.; Currah, L. (Eds.) *Allium Crop Science: Recent Advances*. New York: CABI 13:311-327.

18. Takaichi M, Yamamoto M, Nagakubo T, Oeda K (1998) Four garlic viruses identified by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction and their regional distribution in Northern Japan. *Plant Disease* 82(6):694-698.

CONCLUSÕES GERAIS

- Há vantagem na utilização de alho semente provenientes de cultura de tecido até três anos sucessivos de plantio por ter produtividade mais elevada comparadas com a semente proveniente de plantas infectadas com vírus;
- Os bulbilhos aéreos são viáveis para multiplicação de semente apenas se forem provenientes de matrizes isentas de vírus;
- Folhas mais jovens são recomendadas para análise dos potyvirus em alho, entre os 21 e 63 dias após o plantio, devido a alta concentração de vírus;
- Diversos testes (ELISA, DIBA colorimétrico, DIBA quimioluminescente, PCR em tempo real) podem ser utilizados para detecção do LYSV, diferindo apenas na sua sensibilidade e dependendo da concentração da amostra.