

Brasília, DF
Dezembro, 2001

Autores

Antonio Carlos Torres
Eng. Agrônomo, Ph.D.
Embrapa Hortaliças

André Nepomuceno Dusi
Eng. Agrônomo, Ph. D.
Embrapa Hortaliças

Renato de Oliveira
Resende
Eng. Agrônomo, Ph. D.
Universidade de
Brasília

José Amauri Buso
Eng. Agrônomo, Ph.D.
Embrapa Hortaliças

Produção de Alho-Semente com Alta Qualidade Fitossanitária Mediante Cultura de Ápices Caulinares

Introdução

Em geral, as cultivares de alho são agâmicas, não produzindo sementes botânicas viáveis. Por isso, sua propagação é feita mediante o uso de bulbilhos que se formam anualmente em seu bulbo. Este tipo de propagação faz com que muitas doenças causadas por fungos, bactérias e, principalmente, vírus sejam transmitidas e intensificadas entre os plantios sucessivos, acarretando diminuição da produtividade e qualidade do produto colhido.

Em alho, as infecções de etiologia viral produzem sintomas foliares de estrias cloróticas variáveis de amarelo-claro a verde-claro (Figura 1), redução do porte da planta e do tamanho dos bulbos (Figuras 2 e 3). Vários vírus são indicados como responsáveis por esses sintomas. Geralmente, formam complexos com dois ou mais vírus com características similares e difíceis de serem separados.

No levantamento realizado por Dusi et al. (1994), mediante Isem - Immuno Sorbent Electron Microscopy - com decoração de partículas virais, avaliou-se grande número de amostras de alho provenientes de regiões produtoras

dos Estados de Minas Gerais, do Espírito Santo, de Santa Catarina, do Ceará, de Goiás e do Distrito Federal. Todas as amostras analisadas encontravam-se infectadas por pelo menos dois dos quatro vírus testados.

Até o fim da década de 90, houve grande alteração na taxonomia de diversos vírus pelo International Committee of Taxonomy of Viruses - ICTV - bem como a caracterização de novas espécies de vírus que infectam o gênero *Allium*. Portanto, as descrições de vírus publicadas anteriores

Foto: André Nepomuceno Dusi



Fig. 1. Planta de alho mostrando estrias amarelas nas folhas, sintomas típicos de infecção por vírus.

Foto: André Nepomuceno D'Al



Fig. 2. Ensaio de campo com plantas de alho originadas de alho-semente comercial (a), alho-semente de plantas com uma exposição a campo (b) e alho-semente livre de vírus produzido em casa de vegetação (c).

a 1999 devem ser interpretadas com cautela. Na tabela 1, estão relacionados os principais vírus que ocorrem em alho.

Dentre os vírus relatados em alho, os seguintes *Potyvirus* são os mais importantes do ponto de vista econômico: *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) e *Leek yellow stripe virus* (LYSV). Além desses, o *Garlic common latent virus* (GarCLV, *Carlavirus*) e recém-descritas espécies de *Allexivirus* têm sua ocorrência relatada no Brasil. (Fajardo et al., 2001; Melo Filho et al., 2001).

Uma das maneiras utilizadas para aumentar a produtividade desta cultura é a obtenção de alho-semente livre de patógenos, via cultura de ápices caulinares (Havranek, 1972; Wang & Huang, 1974; Daniels, 1977; Conci et al., 1986; Conci & Nome 1991). A estratégia consiste em reproduzir plantas a partir de células ou tecidos retirados de partes da planta supostamente livres de patógenos. A eficiência desse processo pode ser aumentada se as plantas infectadas forem

submetidas, antes da excisão dos ápices caulinares, à termoterapia (37°C, por um período de 30 a 40 dias). As plantas obtidas são indexadas e a produção de alho-semente é feita em condições controladas.

Na Embrapa Hortaliças, alho livre de vírus das cultivares Amarante e Caçador foi obtido via cultura de ápices caulinares associado à

Foto: Antonio Carlos Torres



Fig. 3. Bulbos de alho provenientes de planta livre de vírus (esquerda) e planta infectada (direita).

termoterapia (Torres et al., 2000), com uma eficiência média do processo de 60%. No curto prazo, esse enfoque é a melhor alternativa para a obtenção de alho-semente livre de patógenos, e com alta qualidade fisiológica, para, posteriormente, ser utilizado pelos produtores. Este processo possibilita aumentos de 100% a 200% na produtividade e maior número de bulbos com tamanho nas classes de maior valor comercial para a cultivar Amaranthe nas condições de cultivo avaliadas em diferentes regiões do Brasil (Fajardo, 1998; Tanabe, 1999, Melo Filho et al., 2000, Dusi et al., 2001). Nos países onde foram conseguidas plantas livres de vírus, foram comprovados aumentos dos rendimentos por área que variaram entre 3% e 70% (Havranek, 1974; Marrou et al., 1974).

Metodologia de produção de plantas livres de vírus

Bulbilhos de alho (*Allium sativum* L.) das cultivares Caçador e Amaranthe são mantidos em câmara fria a 4°C, até alcançarem um índice visual de superação de dormência - IVSD - de 80%, e são selecionados por tamanho, para homogeneizar o desenvolvimento *in vitro*.

Em seguida, os bulbilhos são colocados em bandejas, e o conjunto é mantido em estufa a 37°C, por um período de 30 a 40 dias. Esses bulbilhos são utilizados como fonte de explante. Após a termoterapia, os bulbilhos sofrem cortes transversais e longitudinais para eliminação das folhas protetoras. Ápices com 10 a 20 mm de tamanho são desinfestados com solução de

Tabella 1. Principais vírus relatados em alho.

Agente etiológico	Acrônimo	Gênero/Família
<i>Garlic dwarf virus</i>	GDV	<i>Fijivirus/Reoviridae</i>
<i>Garlic common latent virus</i>	GarCLV	<i>Carlavirus/Closteroviridae</i>
<i>Garlic latent virus</i>	GarLV	<i>Carlavirus/Closteroviridae</i>
<i>Garlic miteborne filamentous virus</i>	GarMbFV	<i>Allexivirus/Closteroviridae</i>
<i>Garlic virus A</i>	GarV-A	<i>Allexivirus/Closteroviridae</i>
<i>Garlic virus B</i>	GarV-B	<i>Allexivirus/Closteroviridae</i>
<i>Garlic virus C</i>	GarV-C	<i>Allexivirus/Closteroviridae</i>
<i>Garlic virus X</i>	GarV-X	<i>Allexivirus/Closteroviridae</i>
<i>Leek yellow stripe virus</i>	LYSV	<i>Potyvirus/Potyviridae</i>
<i>Onion yellow dwarf virus</i>	OYDV	<i>Potyvirus/Potyviridae</i>
<i>Shallot latent virus</i>	SLV	<i>Carlavirus/Closteroviridae</i>
<i>Shallot virus X</i>	ShV-X	<i>Allexivirus/Closteroviridae</i>

hipoclorito de sódio a 0,5%, durante 20 minutos e, em seguida, lavados em água destilada e autoclavada. Os explantes são excisados em condições assépticas, em capela de fluxo laminar, e consistem do meristema apical com um primórdio foliar e porção subjacente do caule (Figura 4).

Foto: André Neomerceno Da sil

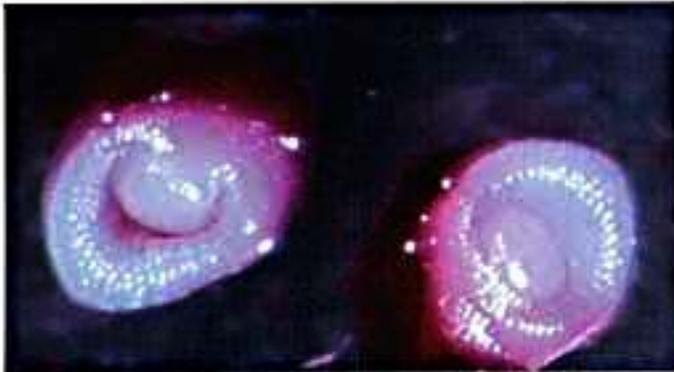


Fig. 4. Ápices caulinares de alho constituído do meristema apical e primórdio foliar usado para o estabelecimento das culturas in vitro.

Indução de parte aérea

O meio de cultura básico usado para indução e diferenciação de parte aérea é composto de sais minerais de MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 3% de sacarose, 0,2% de gelrite e, em mg. L⁻¹ i-inositol, 100; glicina, 2,0; tiamina.HCl, 1,0; piridoxina.HCl, 0,5; ácido nicotínico, 0,5; isopenteniladenina, 0,1 e ácido indolbutírico, 0,1.

Os meios são distribuídos em tubos de ensaio de 150 x 25 mm, em quantidades de 12,5 mL por tubo. Os tubos são fechados com tampas de polipropileno e autoclavados a 121°C e 103 KPa por 15 minutos.

Os explantes são excisados em capela de fluxo laminar, colocados individualmente em tubos de ensaio contendo meio nutritivo, e o conjunto mantido em câmara de crescimento com intensidade luminosa de 62 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de

25 \pm 2°C. Após a formação e desenvolvimento da parte aérea, com um pequeno microbulbo na base, os propágulos são transferidos para meio de crescimento dos microbulbos.

Crescimento dos microbulbos

Brotações com microbulbos na base são transferidas para meio de cultura composto de sais minerais de MS, 6% de sacarose e 0,2% de gelrite e, em mg.L⁻¹: i-inositol, 100; glicina, 2,0; tiamina. HCl, 1,0; piridoxina.HCl, 0,5 e ácido nicotínico, 0,5.

Após 60 a 80 dias, os microbulbos, com aproximadamente 4 a 8 mm de diâmetro, são colhidos, secados ao ar e mantidos em câmara fria a 4°C, por um período de 60 dias para quebra de dormência. Em seguida os microbulbos são plantados em vasos, com mistura de areia e vermiculita, autoclavados, na proporção 1:1 (v:v). Os microbulbos que não brotam são recolhidos, lavados, secados ao ar e, novamente, mantidos em câmara fria para quebra de dormência.

Indexação das plantas

Em uma primeira etapa, os microbulbos desenvolvidos in vitro são transplantados para os vasos mantidos na câmara de crescimento acima descrita. As plantas que deles se desenvolvem são indexadas por dot-Elisa (Elisa em membrana de nitrocelulose), utilizando-se um anti-soro policlonal polivalente (Tanabe, 1999) (Figura 5). As plantas infectadas são descartadas. Os bulbos das plantas negativas nesta primeira multiplicação são plantados em casa de vegetação no ano seguinte, e as plantas resultantes são novamente indexadas por dot-Elisa. As plantas infectadas são descartadas e as plantas negativas são

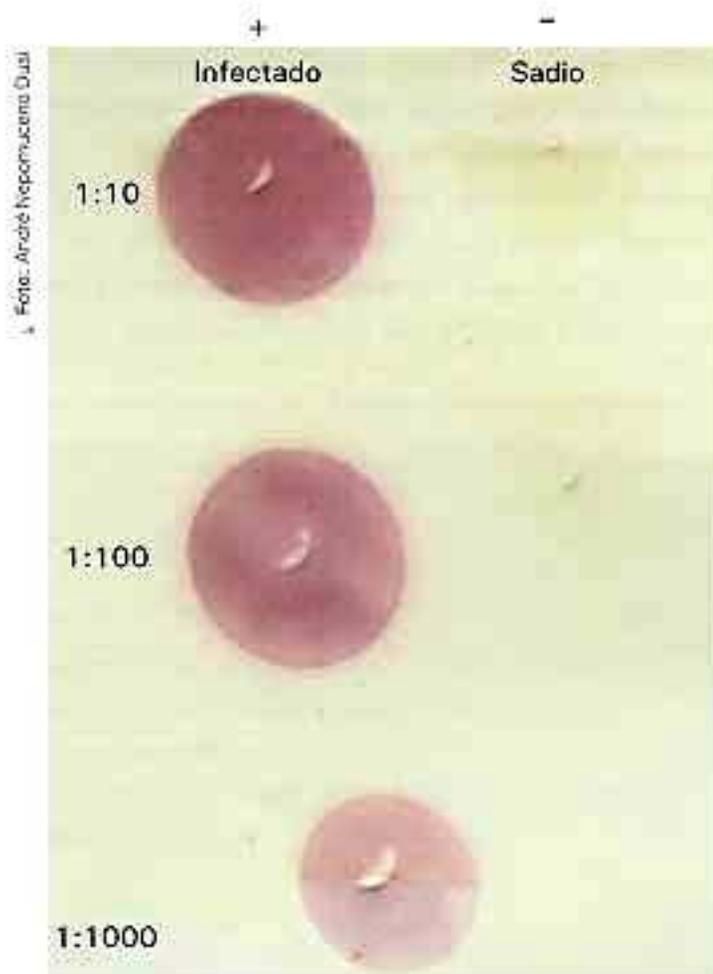


Fig. 5. Dot-Elisa em membranas de nitrocelulose. Pontos de coloração arroxeada indicam plantas infectadas. A diferença na intensidade da cor é devido ao título de vírus em cada amostra.

testadas por Isem com ou sem decoração de partículas, utilizando-se anti-soro polivalente (Gama & Ávila, 1988). Esse sistema foi validado utilizando-se plantas sabidamente infectadas com o complexo viral (Dusi et al., 1994) (Figura 6).

Produção de alho-semente livre de vírus em condições fitossanitárias controladas

Os bulbilhos livres de vírus após a indexação são mantidos em telados construídos com telas à prova de afídeos com uma antecâmara na entrada, em vasos mantidos em bancadas. O substrato utilizado é composto de solo de

cerrado, esterco de gado e palha de arroz parcialmente carbonizada, na proporção de 3:1:1 (v:v:v), acrescido de 100 g de adubo da fórmula 4-30-16 e 100 g de calcário dolomítico por 50 L da mistura. A esterilização do substrato é feita com vapor de água, em esterilizador de solo desenvolvido na Embrapa Hortaliças, em que o vapor percola a mistura durante 5 horas seguidas (Silva et al., 1998, Silva et al., 2001).

As plantas obtidas são pulverizadas semanalmente durante todo o ciclo da cultura com inseticidas específicos para controle de trips, ácaros e afídeos e fungicidas para doenças fúngicas da parte aérea. A cada aplicação é utilizado um inseticida/acaricida dentre os registrados para uso na cultura. São utilizados os seguintes princípios ativos:

- 1) Inseticidas: deltamethrin, imidacloprid, carbaryl, fenitrothion;
- 2) Fungicidas: thiophanate methyl, micozeb, enxofre.

As plantas são adubadas em cobertura com nitrocálcio na dosagem de 1 g por vaso de 1,5 L de substrato, aproximadamente, aos 45 dias do plantio. Para aumentar a população de plantas nos telados, em vasos com volume de 1,5 L, são plantados de 3 a 5 bulbilhos por vaso.

Nas primeiras multiplicações com plantas ou bulbilhos produzidos na condição *in vitro*, é comum a produção de bulbos com um único bulbilho. Nas multiplicações seguintes há formação de múltiplos bulbilhos nos bulbos. Têm sido obtidos 8 a 10 bulbilhos por bulbo. O objetivo, nesta multiplicação, é obter o maior número de bulbilhos por área de telado, independentemente do tamanho, já que outras multiplicações serão necessárias para que os bulbilhos atinjam tamanho para uso comercial na produção de alho-semente.

As irrigações dos vasos são feitas diariamente quando plantados em telados cobertos com plástico transparente. Próximo ao final do ciclo, a irrigação é interrompida, e as plantas são deixadas a secar no próprio vaso. Após 15 a 20 dias é feita a colheita dos bulbos, com o corte da parte aérea no momento da colheita.

Os bulbos são mantidos em caixas de plástico furadas para ventilação, em local seco e fresco, e são debulhados pouco antes do próximo plantio. A época de plantio é a mesma utilizada no cultivo para produção comercial de alho-consumo na região do Brasil Central (plantios em abril/maio e colheita em setembro/outubro).

Foto: Antite Nipmucena Duri

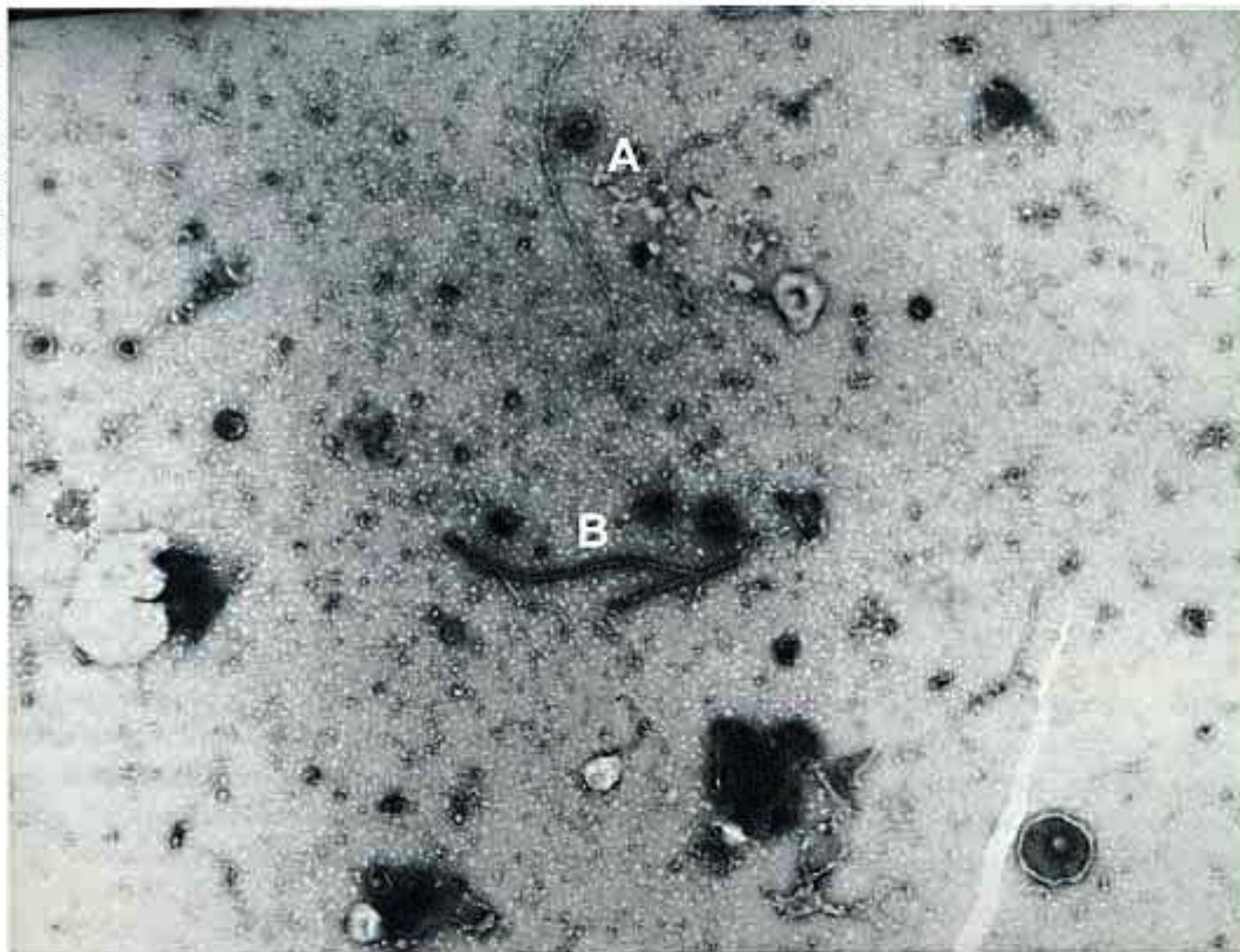


Fig. 6. ISEM utilizando-se anti-soro contra GarCLV. A: partícula não decorada; B: partícula decorada.

Referências bibliográficas

CONCI, V.C. & NOME, S.F. Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. *Journal of Phytopathology*, v.132, p.186-192, 1991.

CONCI, V.C.; MORICONI, D.N.; NOME, S.F. Cultivo de meristemas apicais de seis tipos clonales de alho (*Allium sativum* L). *Phyton*, v.46, n.2, p.187-194, 1986.

DANIELS, J. Regeneração de clones de alho (*Allium sativum* L.) infectados por um Potyvirus.

1977. 56p. Tese (Mestrado em Fitopatologia) – Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Brasília, Brasília,DF.

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

DUSI, A. N.; TORRES, A. C.; ÁVILA, A. C.; BUSO, J. A. Degenerescence of virus-free garlic-seed in Buriçis, MG. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, p.517, 2001. Suplemento. Resumo.

FAJARDO, T. V. M.; NISHIJIMA, M.; BUSO, J. A.; TORRES, A. C.; ÁVILA, A. C.; RESENDE, R. O. Garlic viral complex: identification of *Potyvirus* and *Carlavirus* in Central Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, n.4, p.619-626, 2001.

FAJARDO, T. M. V. Estudos da degenerescência por viroses e caracterização molecular do complexo viral da cultura do alho. 1998. 113f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília,DF.

GAMA, M.I.C.S.; ÁVILA, A.C. Detecção de vírus em alho por látex sensibilizado e microscopia eletrônica imuno-específica. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.13, n.1, p.66-69, 1988.

HAVRANEK, P. Effect of virus disease on garlic yield. *Ochrana Rostlin*, v.10, p.251-256, 1974.

HAVRANEK, P. Viruprosté klony Cesneku Kuchynského Zishané meristemických Katur. *Ochrana Rostlin*, v.8, p.291-298, 1972.

MARROU, J.; MESSIAEN, M.C.; QUIOT, J.P.; LEROUX, J.P. La selection sanitaire des semences d'ail. In: GNIS Journées Nationales

de l'ail, Beaumont de Lomagne, 7 et 8 mai: 21-24. 1974.

MELO FILHO, P. A.; TANABE, C. M. N.; DUSI, A. N.; TORRES, A. C.; ÁVILA, A. C.; BUSO, J. A.; RESENDE, R. O. Degeneration of garlic (*Allium sativum* L.) plants caused by virus infection after four sequential field generations. *Virus Reviews & Research*, v.5, p.198, 2000. Resumo.

MELO FILHO, P. A.; TANABE, C. M. N.; DUSI, A. N.; TORRES, A. C.; ÁVILA, A. C.; BUSO, J. A.; RESENDE, R. O. Primeiro relato de *Allexivirus* associado a plantas de alho no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, p. 535, 2001. Suplemento. Resumo.

MURASHIGE, T. ; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.

SILVA, J.B.C.; FALCÃO, L.L.; OLIVEIRA-NAPOLÊÃO, I.T. Sistema para desinfestar substratos para produção de mudas utilizando-se vapor de água. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1998. 5p. (EMBRAPA-CNPQ. Comunicado Técnico da Embrapa Hortaliças, 7).

SILVA, J.B.C.; NAPOLÊÃO-OLIVEIRA, I.T.; FALCÃO, L.L. Desinfestação de substratos para produção de mudas, utilizando vapor de água. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.19, n.2, p.155-158, jul. 2001.

TANABE, C. M. N. Avaliação da degenerescência em campo causada por fitovirose na cultura do alho (*Allium sativum* L.). 1999. 93f. Tese (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília,DF.

TORRES, A. C.; FAJARDO, T. V.; DUSI, A. N.; RESENDE, R. O.; BUSO, J. A. Shoot tip culture and thermotherapy for recovering virus-free

plants of garlic. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.18, p.192-194, 2000.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQYET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R. E WICKNER, R. B. (Ed.) *Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses:*

seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000.1161p.

WANG, P.; HUANG, L. Studies on the shoot meristem culture of (*Allium sativum* L.). *Journal of the Chinese Society of Horticultural Science*, v.20, p.79-87, 1974.

Agradecimentos:

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia (CBAB), e ao INTA/Córdoba pelo apoio às pesquisas que resultaram nessa publicação.

Circular Técnica, 27

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Hortaliças
Km 09 BR-060 Rodovia Brasília/Anápolis
Fone: (61) 385-9009
Fax: (61) 385-9042
E-mail: sac.hortalicas@embrapa.br

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO



1ª edição
1ª impressão (2001): 1000 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: Wellington Pereira
Secretário-Executivo: Sulemista T. Braz
Membros: Adonal Gimenez Calbo (Editor Técnico)
André Nepomuceno Dusi
Carlos Alberto Lopes
Dione Melo da Silva (Editor de Arte)
Maria Alice de Medeiros
Maria Fátima Bezerra Ferreira Lima
Waldir Aparecido Marouli
Worley Marcos Nascimento

Expediente

Supervisor editorial: Dione Melo da Silva
Tratamento das ilustrações: Athalia Gráfica
Editoração eletrônica: Formato 0