

Desenvolvimento de Tecnologia de Produção de Alho-Semente Livre de Vírus Fase II. Relatório Final do Projeto 05.1999.025



República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Marcus Vinicius Pratini de Moraes
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Conselho de Administração

Márcio Fortes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast
José Honório Accarini
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal
Diretor-Presidente

Dante Daniel Giacomelli Scolari
Elza Ângela Battaglia Brito da Cunha
José Roberto Rodrigues Peres
Diretores-Executivos

Embrapa Hortaliças

Ruy Rezende Fontes
Chefe-Geral

Domingos Alfredo de Oliveira
Chefe-Adjunto de Administração

Wellington Pereira
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Washington Luiz Carvalho e Silva
Chefe-Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1415-2312

Dezembro, 2002

Documentos 46

Desenvolvimento de Tecnologia de Produção de Alho-Semente Livre de Vírus Fase II. Relatório Final do Projeto 05.1999.025

Brasília, DF
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Hortaliças

BR 060 km 09 Rodovia Brasília/Anápolis

Caixa Postal 218

70359-970 Brasília - DF

Telefone (61) 385-9009

Fax (0xx61) 556 5744

<http://www.cnph.embrapa.br>

e-mail: sac.hortalicas@embrapa.br

Comitê Técnico Interno

Presidente: Wellington Pereira

Membros: Adonai Gimenez Calbo

Carlos Alberto Lopes

Celso Luiz Moretti

Dejoel de Barros Lima

Geni Litvin Villas Bôas

Jairo Vidal Vieira

João Maria Charchar

Nozomu Makishima

Osmar Alves Carrijo

Waldir Aparecido Marouelli

Warley Marcos Nascimento



Embrapa

Unidade:	
Valor aquisição:	
Data aquisição:	
N.º N. Fiscal:	
Formação:	
N.º OCS:	
Origem:	
N.º Registro:	003.114

Normalização Bibliográfica: Maria Fátima B. F. Lima

Revisão: Comitê Técnico Interno

Diagramação: Sulamita Teixeira Braz e Maria Amélia de Amaral e Elói

Tiragem: 50 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
Constitui violação dos direitos autorais (Lei n.º 9.610).

Desenvolvimento de tecnologia de produção de alho-semente livre de vírus: fase II: relatório final do projeto 05.1999.025 / Equipe técnica, José Amauri Buso [et al.]. -- Brasília: Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, 2002.

00 p. (EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. Documentos, 46)

ISSN: 1415-2312

1. Alho-semente - Doença - Vírus. 2. Alho-semente - Livre de vírus. 3. Alho-semente - Cultura de tecido. I. Buso, J. A. II. Série.

CDD: 635.26

Equipe Técnica

José Amauri Buso (líder), Ph.D., Melhoramento,
Embrapa Hortaliças,
buso@cnph.embrapa.br

André Nepomuceno Dusi, Ph.D.,
Fitopatologia/Virologia, Embrapa Hortaliças,
dusi@cnph.embrapa.br

Dione Melo da Silva, M.Sc., Transferência de
Tecnologia, Embrapa Hortaliças,
dione@cnph.embrapa.br

Antonio Carlos Torres, Ph.D., Fisiologia/Cultura de
Tecidos, Embrapa Hortaliças,
torres@cnph.embrapa.br

Antônio Carlos de Ávila, Ph.D.,
Fitopatologia/Virologia, Embrapa Hortaliças,
avila@cnph.embrapa.br

Renato Rezende

Péricles Albuquerque de Melo Filho, estudante de
Doutorado da UnB

Jose de Almeida Souza

Leni L. C. Fonseca

Adnondas F. Carmo

Nivaldo A. Oliveira

Sumário

Desenvolvimento de Tecnologia de Produção de Alho-Semente Livre de Vírus – Fase II. Relatório final do projeto 05.1999.025.....	11
Resumo.....	11
Vigência.....	14
Resultados, conclusões e recomendações.....	14
Subprojeto Recuperação de Plantas Livres de Vírus de Genótipo - Elite de Alho e sua Multiplicação em Condições Fitossanitárias Controladas.....	14
Subprojeto Caracterização Molecular do Complexo Viral do Alho: Desenvolvimento de Sondas para Detecção dos Vírus do Complexo.....	15
Subprojeto Estudo da Degenerescência por Víroses na Cultura do Alho em Diversas Regiões do País.....	16
Subprojeto Limpeza de Vírus e Estudo da Degenerescência de Alho-Semente no Estado de São Paulo.....	19
Subprojeto Ações de Validação e Difusão de Tecnologias em Alho-Semente Livre de Vírus.....	19
Metas programadas e alcançadas.....	22
Potencial de uso dos resultados obtidos.....	24
Difusão de tecnologias, processos, produtos, serviços e conhecimentos e validação de resultados.....	25
Publicações.....	25

Tecnologias, serviços e produtos.....	26
Avaliação geral.....	27
Anexos.....	28
Recuperação de Plantas Livres de Vírus de Genótipo - Elite de Alho e sua Multiplicação em Condições Fitossanitárias Controladas. Relatório final do subprojeto 05.1999.025.01.....	33
Resumo.....	33
Resultados, conclusões e recomendações.....	34
Difusão de tecnologias, processos, produtos, serviços e conhecimentos e validação de resultados.....	35
Publicações.....	35
Caracterização Molecular do Complexo Viral do Alho: Desenvolvimento de Sondas para Detecção dos Vírus do Complexo. Relatório final do subprojeto 05.1999.025.02.....	37
Resumo.....	37
Resultados, conclusões e recomendações.....	37
Publicações.....	39
Tecnologias, processos, produtos, serviços e conhecimentos e validação de resultados.....	40
Estudo da Degenerescência por Virose na Cultura do Alho em Diversas Regiões do País. Relatório final do subprojeto 05.1999.025.03.....	41
Resumo.....	41
Resultados, conclusões e recomendações.....	41
Publicações.....	44
Tecnologias, serviços e produtos.....	44
Avaliação global do andamento.....	45

Ações de Validação e Difusão de Tecnologias em Alho-Semente Livre de Vírus.	
Relatório final do subprojeto 05.1999.025.05.....	46
Resumo.....	46
Resultados, conclusões e recomendações.....	47
Metas planejadas e executadas.....	49
Avaliação final global.....	49
Difusão de tecnologias, processos, produtos, serviços e conhecimentos e validação de resultados.....	50

Desenvolvimento de Tecnologia de Produção de Alho-Semente Livre de Vírus – Fase II. Relatório final do projeto 05.1999.025

Resumo

Sendo o alho uma hortaliça comercialmente propagada de forma vegetativa, há acúmulo de agentes causais de doenças importantes, que são transmitidos de um ciclo de produção a outro via bulbilho contaminado. Dentre estas estão as doenças causadas por vírus, hoje não cobertas pela legislação de produção de alho-semente. Uma das formas de se evitar os danos causados por vírus em alho é via a obtenção de plantas saudáveis e a multiplicação em condições que previnam reinfecções em níveis que causem degenerescência acentuada. Há uma demanda do setor produtivo de alho no país para que se tenha um sistema de produção de alho-semente de melhor qualidade fitossanitária, notadamente livre de viroses.

No subprojeto "Recuperação de plantas livres de vírus de genótipo - elite de alho e sua multiplicação em condições fitossanitárias controladas" foram realizadas as seguintes atividades no projeto: 1- Validação da metodologia de termoterapia- para as cultivares Hozan, com utilização da termoterapia de bulbilhos a seco, que associada a cultura de ápices caulinares, mostrou-se como excelente técnica para produção de plantas de alho livres de vírus das referidas cultivares. 2- Em 1999 foram mantidos em casa de vegetação os estoques de plantas livres de vírus da cultivar Amaranthe. Também foram mantidos in vitro um estoque de segurança de 300 plantas desse material. 3- Também foi validada a metodologia de recuperação de plantas livres de vírus para a cultivar Quitéria. Em 2000 desenvolveram-se as seguintes atividades: 1- Continuação da validação da metodologia de termoterapia - para as cultivares Hozan, Quitéria e Chonan com utilização da termoterapia de bulbilhos a seco, que associada a cultura de ápices caulinares, mostrou-se uma excelente técnica para produção de plantas de alho livres de vírus das referidas cultivares. Em 2001 desenvolveram-se as seguintes atividades: a- Foram produzidos in vitro: 86 microbulbos da cultivar Chonan, 102 microbulbos da cultivar Quitéria, 160 microbulbos da cultivar Hozan, 180 microbulbos da cultivar Caçador, Dos microbulbos produzidos em 2000 e plantados em telado no ano 2001 foram obtidos: 286 bulbos da cultivar Chonan, 207 bulbos da cultivar Quitéria, 20 bulbos da cultivar Branco de Mossoró Foram também produzidos 100 kg de bulbos da cultivar Amaranthe livre de vírus (acima de 400.000 bulbilhos).

No subprojeto "Caracterização Molecular do Complexo Viral do Alho: Desenvolvimento de Sondas para Detecção dos Vírus do Complexo", em 2000 tiveram início os estudos

moleculares sobre *Allexivirus* com a detecção de plantas originadas do Gama/Embrapa Hortaliças e de Água Fria- GO as quais apresentaram resultados sorológicos positivos. Tais resultados foram obtidos através do uso de 3 anti-soros monoclonais e 1 policlonal de *Allexivirus* oriundos do Japão. Em 2001 foram desenvolvidas sondas não radioativas para dois potyvirus e um carlavirus que já haviam sido caracterizados no projeto antecessor. No âmbito deste projeto, foram isolados 4 diferentes espécies de *Allexivirus*. Destas espécies, três foram identificadas com *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV), *Garlic virus C* (GarV-C) e *Garlic virus D* (GarV-D). A identificação foi feita pela comparação da seqüência da capa protéica. Os trabalhos de desenvolvimento de sondas frias para os *Allexivirus* estavam em andamento em 31 12 2001, priorizando-se uma sonda geral para o gênero e, posteriormente, sondas espécie-específicas.

No subprojeto “Estudo da Degenerescência por Víroses na Cultura do Alho em Diversas Regiões do País” dois experimentos foram conduzidos em 1999 com a cultivar Amaranthe com o objetivo de estudar a degenerescência na cultura do alho frente à incidência do complexo viral constituído por OYDV, LYSV e GCLV. Os experimentos foram compostos pelos seguintes tratamentos: plantas livres de vírus, plantas expostas ao complexo viral pela 2ª, 3ª e 4ª vez e material do agricultor (controle). Foram efetuadas ainda identificação e frequência de espécies de afídeos e as taxas de reinfecção viral natural através de DAS-ELISA. Em ambos os experimentos, observou-se pouca expressividade entre os tratamentos para o descritor número de folhas, sendo esse considerado de pouco valor seletivo, contudo, diferença estatística significativa foi verificada entre os tratamentos para altura de plantas e produção de bulbos. A altura das plantas variou entre 17cm e 70 cm. Em geral os tratamentos analisados diferiram do controle que mediu, 36,61 cm enquanto que a média dos demais situou-se em 43,47 cm. Para produção de bulbos, todos os tratamentos foram, em média, 80 % superiores ao controle. Em particular as plantas livres de vírus, foram 113,33 % superiores e as plantas da 4ª exposição ainda conseguiram superá-lo em 50 %, confirmando que até essa geração é viável a produção de alho-semente à partir de bulbilhos livre de vírus. Todos os tratamentos produziram mais de 61,75 % dos bulbos classificados nas classes de 4 a 7, enquanto que o controle situou-se em média mais de 63,87 % de 1 a 3. As espécies de afídeos coletadas com maior frequência foram *Rhopalosiphum* spp., *Lipaphis* sp., *Geopenphigus* sp e *Hyperomyzus* sp.

Em 2000 foram conduzidos três ensaios para avaliar a degenerescência de alho livre de vírus, cv. Amaranthe, em condições de campo. Em Água Fria (GO) e na Embrapa Hortaliças, o ensaio foi composto de seis tratamentos, a saber: 1, alho livre de vírus; 2 a 5, alho com 1, 2, 3 e 4 exposições a campo em anos anteriores; 6, alho-semente comercial. Em Buritis (MG) foi instalado o primeiro ano do experimento, com apenas dois tratamentos: alho livre de vírus e alho-semente comercial. O alho livre de vírus produziu significativamente mais que os demais tratamentos, e o alho-semente comercial produziu significativamente menos que os demais tratamentos. Tratamentos 2 a 5 não diferiram entre si. Entretanto, esta é uma análise preliminar. Em Buritis o alho livre de vírus apresentou produção total significativamente superior ao controle. Apresentou também número de bulbos de classes superiores maior que o alho-semente comercial. Ao fim do ensaio, o alho livre de vírus apresentou 10% de infecção e o controle 97% de infecção. A avaliação realizada por dot-Elisa é qualitativa. Observa-se, entretanto, uma reação mais fraca nas amostras originárias de alho livre de vírus, indicando que a concentração de vírus é menor ou a composição de espécies que estão infectando as plantas é diferente entre os tratamentos.

Em 2001, os ensaios de Brasília e Buritis foram repetidos. Nos dois ensaios foi acrescentada mais uma geração.

Em Buritis, devido a problemas na condução do pivô central onde o ensaio foi implantado, houve uma condição forte de estresse, ocasionando uma baixa produtividade. Entretanto mesmo sob estas condições, as parcelas livres de vírus e com uma exposição a campo apresentaram produtividades em torno de 5,5 t/ha, enquanto o controle apresentou uma média de 1,8. Foi possível obter sementes para continuidade do ensaio no ano de 2002.

Foi implantando um ensaio para determinação da distância e direção de disseminação de vírus no alho, em uma área 1000 m distante de áreas de produção de aliáceas. O experimento constituiu-se de uma área circular de cinco metros de raio (aproximadamente 79 m²), plantado com bulbilhos de alho com alto nível de infecção por vírus (independente de cultivar), circundada por parcelas de 2 m² distribuídas radialmente em 8 raios a N, NE, L, SE, S, SO, O e NO. As parcelas distaram 3,5; 5,5; 8,5; 18,5 e 30,0 m do centro da fonte de inóculo. Não foi observado efeito de direção. Os índices de infecção observados para cada raio foram: raio 1: OYDV: 5,0%; LYSV: 3,8%; Polivalente: 6,25%; raio 2: OYDV: 2,5%; LYSV: 0; Polivalente: 2,5%; raio 3: OYDV: 0; LYSV: 0; Polivalente: 0; raio 4: OYDV: 0; LYSV: 0; Polivalente: 0; raio 5: OYDV: 0,6%; LYSV: 0,6%; Polivalente: 0,6%. O ensaio será repetido em 2002 para confirmação dos resultados.

Do subprojeto 4 o relatório não foi recebido do responsável pelo subprojeto, mesmo após duas solicitações.

No subprojeto "Ações de Validação e Difusão de Tecnologias em Alho-Semente Livre de Vírus" foram implementadas as seguintes ações: 1- Em 1999 foram instaladas 2 Unidades de Observação, nos seguintes locais; Boninal e Bom Jesus da Lapa- BA, com os seguintes resultados Boninal - área de 40 m², com produtividades de 4 t/ha para o material plantado com alho-semente com duas gerações de exposição em campo em Brasília vs 2 t / h com plantio de alho-semente comumente utilizado pelo produtor (contaminado)- parceria EBDA, Já para o de Bom Jesus da Lapa os resultados foram, respectivamente, de 3t / ha e 1,5 t / ha, para uma área de 25m², trabalho realizado em parceria com a CODEVASF. Ainda em 1999 foram instaladas quatro Unidades de Observação de alho- cv Amarante livre de vírus. Duas foram instaladas no Município de Mirangaba e duas na localidade de Caatinga de Moura, Município de Jacobina. Estiveram participando 22 pequenos produtores rurais dos dois municípios.

2- No ano de 2000 foram implementadas 5 Unidades de Validação, sendo quatro do conceito de produção própria de alho- semente, envolvendo produtores de Burutis-MG, Taquarendi/Miranga, BA, Santa Maria do Jeribá-ES, e Distrito Federal. A última UV foi instalada junto a um produtor de alho no sistema orgânico. O alho livre d vírus produziu 140% mais que o alho produzido a partir de alho-semente contaminado. 3- Em 2001 foram implementadas uma Unidade de validação do conceito de produção própria de alho-semente a partir de alho-semente livre de vírus no Município de Taquarendi-BA). Os materiais produzidos em 2000 foram todos perdidos, segundo os condutores porque foram produzidos fora da época normal no ano anterior. Os repassados para plantio na primeira exposição fora do telado produziram, a partir de 3.000 bulbilhos, 14 kg de bulbos curados, que serão utilizados na continuação dos trabalhos em 2002. Outra Unidade foi instalada no Município de Água Linda, GO, junto a um produtor tradicional de alho-consumo, mas os dados não foram recuperados para o presente relatório. O subprojeto ficou aquém das expectativas iniciais, pois muitas dificuldades foram encontradas no estabelecimento de parcerias tanto com instituições governamentais (estaduais e municipais) como com produtores privados.

Vigência

De 2 de janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2001.

Resultados, conclusões e recomendações

Subprojeto Recuperação de Plantas Livres de Vírus de Genótipo – Elite de Alho e sua Multiplicação em Condições Fitossanitárias Controladas

Os resultados obtidos em 1999 foram:

Validação da metodologia de termoterapia - para as cultivares Chonan e Quitéria, com utilização da termoterapia de bulbilhos a seco, que associada a cultura de ápices caulinares, mostrou-se uma excelente técnica para produção de plantas de alho livres de vírus das referidas cultivares. Aproximadamente, 2850 bulbilhos foram colocados em bandejas, sem uso de substrato, e o conjunto foi mantido, respectivamente, a temperaturas de 37°C por um período de 35 e 40 dias. Em adição, de janeiro a dezembro de 1999 foram produzidos aproximadamente 12.000 bulbos em condições controladas (casa de vegetação e telados), livres de vírus, das plantas produzidas em 1998.

As recomendações do subprojeto foram:

- 1- O processo de termoterapia a seco dos bulbilhos (i.e., deixar por 35 dias os bulbilhos debulhados de alho a temperatura de 35 ° C) pode ser recomendado para o processo de recuperação de plantas livres de vírus.
- 2- O meio de cultura seguinte demonstrou ser adequado para uso no processo de obtenção de alho livre de vírus: Sais minerais MS, 3% de sacarose, 0,2% de gelrite, e em mg/l: i-inositol, 100; tiamina.HCl, 1,0; piridoxina.HCl, 0,5; ácido nicotínico, 0,5; glicina, 2,0; AIA, 0,1 e CIN 0,1. mistura orgânica de White; 3- Para a micropropagação rápida de alho foi otimizado um meio, como segue : meio básico (Sais minerais MS, 3% de sacarose, 0,2% de gelrite, e em mg/l: i-inositol, 100; tiamina.HCl, 1,0; piridoxina.HCl, 0,5; ácido nicotínico, 0,5; glicina, 2,0; AIA, 0,1 e CIN 0,1. mistura orgânica de White), suplementado com 0,2 mg/l de 2ip e 0,1 mg/l de AIB. Neste meio, além dos bulbilhos produzidos serem mais uniformes, ocorreu menor produção de calo. Como não foi possível obter-se bulbilhos da cultivar Jonas com identidade genética comprovada e a cultivar Hassan foi substituída pela Chonan no ano de 1999, decidiu-se concentrar os trabalhos nas cultivares Quitéria e Chonan.

Os resultados obtidos em 2000 foram:

Validação da metodologia de termoterapia - para as cultivares Hozan, com utilização da termoterapia de bulbilhos a seco, que associada a cultura de ápices caulinares, mostrou-se uma excelente técnica para produção de plantas de alho livres de vírus das referidas cultivares. Aproximadamente, 2300 bulbilhos foram colocados em bandejas, sem uso de substrato, e o conjunto foi mantido, respectivamente, a temperaturas de 37°C por um período de 35 e 40 dias. Foram produzidos 150 bulbos. Em adição, de janeiro a dezembro de 2000 foram produzidas aproximadamente 410.000 bulbilhos da cultivar Amaranthe em condições controladas (casa de vegetação e telados), livres de vírus, das plantas produzidas em 1999. Para a cv Chonan foram produzidos 129 bulbos e 272 bulbos da cultivar Quitéria, além de 150 microbulbilhos da cultivar Hozan.

Os resultados obtidos em 2001 foram:

1. Foram produzidas "in vitro" as seguintes quantidades: 86 microbulbos da cultivar Chonan; 102 microbulbos da cultivar Quitéria; 160 microbulbos da cultivar Hozan; 180 microbulbos da cultivar Caçador;
2. Dos microbulbos produzidos em 2000 e plantados em telado no ano de 2001, foram obtidos: 286 bulbos da cultivar Chonan; 207 bulbos da cultivar Quitéria e 20 bulbos da cultivar Branco de Mossoró;
3. Foram também produzidos 100 kg de bulbos da cultivar Amarante, o que corresponde a mais de 400.000 bulbilhos.

Subprojeto Caracterização Molecular do Complexo Viral do Alho: Desenvolvimento de Sondas para Detecção dos Vírus do Complexo

Em 1999 foram realizadas as seguintes atividades:

1- Caracterização final dos genes da capa protéica do OYDV, LYSV e GCLV:
O alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidos revelou que ocorre alta homologia entre os isolados de OYDV-G e LYSV estudados e outros isolados dos mesmos vírus, depositados em banco de dados. As maiores homologias de aminoácidos deduzidos foram 99,2% e 88,6%, para o OYDV-G e LYSV, respectivamente (tabela 3.1). O alinhamento da seqüência de aminoácidos deduzidos, do isolado de GCLV estudado com outros isolados do mesmo vírus, revelou que ocorre alta homologia (94,5%) entre este isolado e outro de GCLV (tabela 3.1). Estes resultados confirmam aqueles obtidos através de comparações de nucleotídeos. Ocorreu também a produção de primers e sondas específicas para esses vírus. O trabalho vem confirmar, de forma *precisa e detalhada*, através da utilização de PCR, seqüenciamento de nucleotídeos e emprego de sondas moleculares, que a cultura do alho encontra-se infectada por um complexo viral, de pelo menos três vírus, dois Potyvirus, OYDV-G e LYSV, e um Carlavirus, GCLV.

Houve também a produção de antissoros e ajustes para execução de teste ISEM (ver protocolo 1, no anexo).

Foram feitas inoculação mecânica, inoculação por afídeos e detecção de allexvirus. As inoculações efetuadas do alho supostamente infectado com *potyvirus* e *carlavirus* em *C. quinoa* e *C. amaranticolor* apresentaram-se lesões locais típicas e estas foram inoculadas em várias plantas como *A. fistulosum*, Cebola IPA-3, alho porró e cebola Conquista. Estas foram testadas por Dot-ELISA, para averiguar quais reagiriam com os controles OYDV, LYSV, SLV, SYSV, GV-A, GV-B, GV-C, GV-D e OMBIV-Wakegi isolate, e dentre estes apenas o Garlic virus C foi isolado, o mite-borne virus. Portanto, esse novo vírus pertencente a grupo dos allexvirus foi encontrado pela primeira vez no Brasil.

No ano de 2000 tiveram início os estudos moleculares sobre *Allexivirus* com a detecção de plantas originadas do Gama/CNPH e de Água Fria-GO as quais apresentaram resultados sorológicos positivos. Tais resultados foram obtidos através do uso de 3 anti-soros monoclonais e 1 policlonal de *Allexivirus* oriundos do Japão. Após a detecção, foi realizada extração de RNA, com uso do tampão isocianato de guanidina, das possíveis espécies de vírus denominadas de GarV-A, GarV-B, GarV-C e GarV-D. Como passo seguinte foram realizadas reações de RT-PCR para construção de cDNA através do uso de primers previamente desenhados com base em seqüências obtidas via internet dos isolados japoneses. Posteriormente foram obtidos clones com uso de células competentes de *Escherichia coli* e ligação dos respectivos insertos em plasmídeos de pGen-T Vector. De início dois isolados de 762 pb supostamente de GarV-A foram encaminhados à UFV cujos resultados revelaram apresentar 96,6 % de homologia de aminoácido e nucleotídeo com *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV), um vírus já classificado e só detectado até o momento na Argentina e em vias de publicação, porém, antes do seqüenciamento já sugeria

ser diferente do que fora isolado no Japão uma vez que a enzima Hind III não corta o isolado japonês ao meio e isso foi fato ocorrido com nosso suposto GarV-A. A extração obtida de outra planta revelou reação sorológica negativa com os anti-soros de GarV-A, GarV-B e GarV-C. Tal isolado só reagiu positivamente com o anti-soro policlonal misto de *Allexivirus*, e isso sugere ser este isolado de alguma espécie diferentes dos três primeiros a qual poderá ser o próprio GarV-D ou algo diferente desse.

Em 2001, foram encaminhados ao Instituto Biológico para seqüenciamento clones de GarV-C e GarV-D. Nosso possível GarV-C (781 pb) revelou 95 % de similaridade de aminoácido e 92,3 % de nucleotídeo com o GarV-C japonês e nosso GarV-D (753 pb) revelou 92,6 % de homologia de nucleotídeo e 96,8 % de aminoácido com o GarV-D japonês.

Clones de GarV-B foram encaminhados à UnB para seqüenciamento como também uma banda de aproximadamente 400 pb obtida com um par de primer universal desenhado para detectar todos os *Allexivirus* de alho.

Os clones de GarV-B deram resultados negativos devendo o trabalho continuar ao final do segundo semestre de 2001.

A banda de aproximadamente 400 pb é na verdade de 459 pb e apresenta: 90% de homologia com GarV-C, 71% co GarV-A, 72% com GarV-B, 73% com GarV-D, 74% com Shallot vírus X e 76% com GarVMbFV.

Em 2001, foram seqüenciados os genes completos da capa protéica de duas espécies de *Allexivirus*:

- 1- *Garlic virus C*, com 781 pb, apresentando 92,3% de similaridade de nucleotídeos e 95% de similaridade de aminoácidos com o GarV-C japonês encontrado no GenBank.
- 2- *Garlic virus D*, com 753 pb, apresentando 92,6% de similaridade de nucleotídeos e 96,8% de similaridade de aminoácidos com o GarV-D japonês encontrado no GenBank.
- 3- Obtenção e seqüenciamento de uma banda de 459 pb que revelou homologia de 95% com GarV-C

Com os dados de seqüência, os trabalhos de desenvolvimento de sondas para *Allexivirus* serão iniciados no âmbito do projeto 05.2002.001, que se iniciou em janeiro de 2002.

Subprojeto Estudo da Degenerescência por Viroses na Cultura do Alho em Diversas Regiões do País

Em 1999 foram conduzidos dois experimentos com a cultivar Amarante com o objetivo de estudar a degenerescência na cultura do alho frente à incidência do complexo viral constituído por OYDV, LYSV e GCLV. Os experimentos foram compostos pelos seguintes tratamentos: plantas livres de vírus, plantas expostas ao complexo viral pela 2^a, 3^a e 4^a vez e material do agricultor (controle). O delineamento utilizado foi em blocos ao caso com seis repetições. Foram avaliados os seguintes descritores aos 90 dias após o plantio: altura de plantas, número de folhas, peso e classificação de bulbos. Foram efetuadas ainda identificação e frequência de espécies de afídeos e as taxas de reinfecção viral natural através de DAS-ELISA. Em ambos experimentos, observou-se pouca expressividade entre os tratamentos para o descritor número de folhas, sendo esse considerado de pouco valor seletivo, contudo, diferença estatística significativa foi verificada entre os tratamentos para altura de plantas e produção de bulbos. A altura das plantas variou entre 17cm e 70 cm. Em geral os tratamentos analisados diferiram do controle que mediu, 36,61 cm enquanto que a média dos demais situou-se em 43,47 cm. Para produção de bulbos, todos os tratamentos foram, em média, 80 % superiores ao controle. Em particular as plantas livres de vírus, foram

113,33 % superiores e as plantas da 4ª exposição ainda conseguiram superá-lo em 50 %, confirmando que até essa geração é viável a produção de alho-semente à partir de bulbilhos livre de vírus. Todos os tratamentos produziram mais de 61,75 % dos bulbos classificados nas classes de 4 a 7, enquanto que o controle situou-se em média mais de 63,87 % de 1 a 3. As espécies de afídeos coletadas com maior frequência foram *Rhopalosiphum* spp., *Lipaphis* sp., *Geopenphigus* sp e *Hyperomyzus* sp. A taxa de reinfeção viral mostrou um acréscimo médio de X % da 1ª para a 4ª exposição, que situou-se ainda em Y % a menos que o controle.

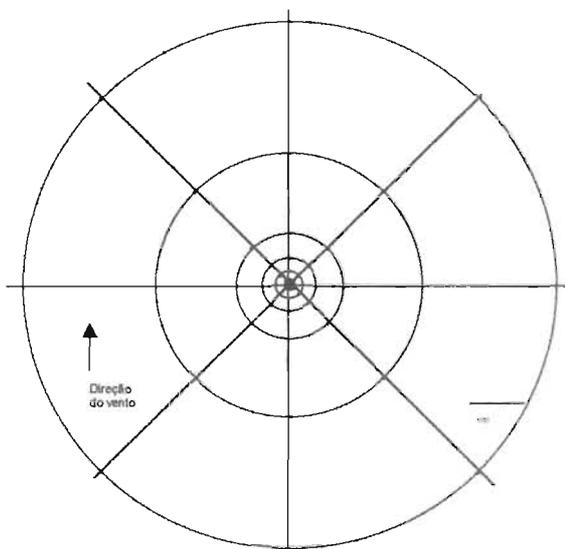
Em 2000 foram conduzidos três ensaios para avaliar a degenerescência de alho livre de vírus, cv. Amaranthe, em condições de campo. Em Água Fria (GO) e na Embrapa Hortaliças, o ensaio foi composto de seis tratamentos, a saber: 1, alho livre de vírus; 2 a 5, alho com 1, 2, 3 e 4 exposições a campo em anos anteriores; 6, alho semente comercial. Em Buritis (MG) foi instalado o primeiro ano do experimento, com apenas dois tratamentos: alho livre de vírus e alho-semente comercial.

Água Fria e Embrapa Hortaliças: Foi avaliada a produção total. O alho livre de vírus produziu significativamente mais que os demais tratamentos, e o alho-semente comercial produziu significativamente menos que os demais tratamentos. Tratamentos 2 a 5 não diferiram entre si. Entretanto, esta é uma análise preliminar. Uma análise de regressão com alho colhido e classificado está em andamento. Análise de infecção está em andamento, sendo executada por um estudante de doutorado da Universidade de Brasília.

Buritis: O alho livre de vírus apresentou produção total significativamente superior ao controle. Apresentou também número de bulbos de classes superiores maior que o alho-semente comercial. Ao fim do ensaio, o alho livre de vírus apresentou 10% de infecção e o controle 97% de infecção. A avaliação realizada por dot-Elisa é qualitativa. Observa-se, entretanto, uma reação mais fraca nas amostras originárias de alho livre de vírus, indicando que a concentração de vírus é menor ou a composição de espécies que estão infectando as plantas é diferente entre os tratamentos.

Em 2001, os ensaios de Brasília e Buritis foram repetidos. Nos dois ensaios foi acrescentada mais uma geração.

Em Buritis, devido a problemas na condução do pivô central onde o ensaio foi implantado, houve uma condição forte de estresse, ocasionando uma baixa produtividade. Entretanto mesmo sob estas condições, as parcelas livres de vírus e com uma exposição a campo apresentaram produtividades em torno de 5,5 t/ha, enquanto o controle apresentou uma



média de 1,8. Foi possível obter sementes para continuidade do ensaio no ano de 2002.

Foi implantado um ensaio para determinação da distância e direção de disseminação de vírus no alho, em uma área 1000 m distante de áreas de produção de aliáceas. O objetivo do ensaio foi verificar:

qual a distância que diferentes vírus se disseminam à partir da fonte de inóculo;
qual o efeito da direção predominante do vento na degenerescência do alho-semente;
quais espécies de vírus são preferencialmente transmitidas em condições de campo.

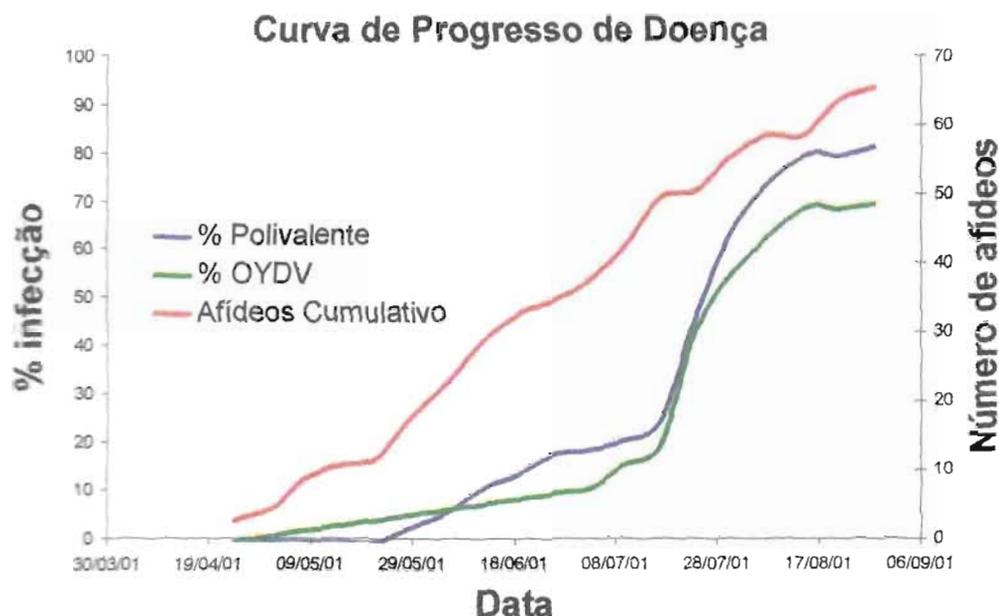
O experimento constituiu-se de uma área circular de cinco metros de raio (aproximadamente 79 m²), plantado com bulbilhos de alho com alto nível de infecção por vírus (independente de cultivar), circundada por parcelas de 2 m² distribuídas radialmente em 8 raios a N, NE, L, SE, S, SO, O e NO. As parcelas distaram 3,5; 5,5; 8,5; 18,5 e 30,0 m do centro da fonte de inóculo.

O experimento foi conduzido sem pulverizações e toda área foi mantida livre de plantas daninhas ao longo do experimento. O experimento foi conduzido por cerca de 150 dias (ciclo médio da cultura). Ao final do período, as parcelas foram colhidas individualmente. Os bulbos produzidos foram amostrados ao acaso, 10% (20 bulbos/parcela), e foram indexados por Dotblot-Elisa utilizando-se anti-soros policlonais específicos para os vírus OYDV, LYSV, e anti-soro polivalente para o complexo viral do alho. Não foi observado efeito de direção. Os índices de infecção observados para cada raio foram: raio 1: OYDV: 5,0%; LYSV: 3,8%; Polivalente: 6,25%; raio 2: OYDV: 2,5%; LYSV: 0; Polivalente: 2,5%; raio 3: OYDV: 0; LYSV: 0; Polivalente: 0; raio 4: OYDV: 0; LYSV: 0; Polivalente: 0; raio 5: OYDV: 0,6%; LYSV: 0,6%; Polivalente: 0,6%.

O ensaio será repetido em 2002 para confirmação dos resultados. Entretanto pode-se obter um forte indicativo de que a distância predominante de disseminação é menor que 5 m e que a distribuição espacial dos vírus que infectam o alho, predominantemente vírus de transmissão com relação do tipo não persistente, acompanham o padrão comum a potyvirus, que se concentram em um curto raio da fonte de inóculo. Isso abre uma perspectiva de localização de áreas de produção de sementes dentro de propriedades onde o alho é cultivado comercialmente, apenas com um isolamento adequado.

Foi implantado no meio de um campo de alho de 2 ha um ensaio para acompanhar o desenvolvimento da epidemia de vírus em alho. Foram plantadas cinco parcelas de 2 m² de alho livre de vírus, com 200 plantas por parcela. Destas, 20 foram marcadas e, semanalmente, uma amostra da folha expandida mais nova foi coletada e levada ao laboratório para ser testada por dot-Elisa com anti-soro polivalente e contra OYDV. Uma armadilha de bandeja verde com água foi colocada no meio do ensaio e os afídeos nela capturados foram contados semanalmente.

Há um indicativo de que o OYDV é prevalente. Entretanto, o experimento será repetido em outra oportunidade para confirmação dos resultados, desta vez utilizando outros anti-soros vírus específicos.



Subprojeto Limpeza de Vírus e Estudo da Degenerescência de Alho-Semente no Estado de São Paulo

Em abril de 1999 foram enviados mais de 420 bulbilhos de alho-semente livre de vírus da c Amarante para a instalação de experimento em São Paulo. No experimento implementado n ESALQ em 1999, para avaliação agrônômica do material, o peso médio de bulbos das class. comerciais superiores do alho produzido a partir de alho-semente livre de vírus foi duas veze maior que o alho infectado (dados apresentados em resumo de congresso em 2000).

Todavia, o líder não recebeu retorno de relatório com os resultados das atividades ali implementadas.

Em 2000 o relatório também não foi recebido do responsável pelo subprojeto.

Deve-se frisar que em nenhum momento o líder foi avisado dos montantes de recursos e as épocas de repasse dos mesmos ao IAC, Instituição onde estava lotado o responsável pelo subprojeto. Portanto, a falta de relatórios pode ter sido relacionado a problemas de falta de recursos, montantes menores e/ou época de liberação dos mesmos. Verbalmente, o responsável informou que os recursos para 99 haviam chegado no final do ano, em valores bastante menores do que o necessário para fazer frente as despesas do subprojeto.

Subprojeto Ações de Validação e Difusão de Tecnologias em Alho-Semente Livre de Vírus

Metas originais versus realizadas do subprojeto:

As metas originais e os resultados obtidos foram:

1- instalação de 7 Unidades de Observação ou de Validação ou de Demonstração de tecnologia em condições reais de produção por ano, com metodologia de produção de alho-consumo a partir de alho-semente livre de vírus;
período: março a dezembro de 1999, 2000, 2001:

Em 1999 foram instaladas 2 Unidades de Observação, nos seguintes locais; Boninal e Bom Jesus da Lapa- BA, com os seguintes resultados Boninal - área de 40 m², com produtividades de 4 t/ha para o material plantado com alho-semente com duas gerações de exposição em campo em Brasília vs 2 t / h com plantio de alho-semente comumente utilizado pelo produtor (contaminado)- parceria EBDA, Já para o de Bom Jesus da Lapa os resultados foram, respectivamente, de 3t / ha e 1,5 t / ha , para uma área de 25m², trabalho realizado em parceria com a CODEVASF.

Ainda em 1999 foram instaladas quatro Unidades de Observação de alho- cv Amaranite livre de vírus. Duas foram instaladas no Município de Mirangaba e duas na localidade de Caatinga de Moura, Município de Jacobina. Estiveram participando 22 pequenos produtores rurais dos dois municípios.

Em 2000 foram instaladas Unidades de validação nos seguintes locais e resultados obtidos:

1- Buritis, MG- Fazenda Campininha, propriedade do Dr. Nicolau Ayoagui

Foi implementada uma Unidade de Validação com alho-semente livre de vírus, comparando-se com o alho- semente utilizado por produtores, contaminado. Foram plantados 10 blocos com 4 m² de alho, cultivar Amaranite livre de vírus e 10 blocos semelhantes com alho-semente normalmente utilizado por produtores, para comparação da produção. Área plantada –80 m². Resultados: parcelas alho-semente livre de vírus - 24,45 kg, parcelas com alho-semente similar ao utilizado pelos produtores- 10,51 kg. Incremento de 132,6 % sobre o alho comum utilizado pelo produtor.

Comentários Gerais:

O responsável pela lavoura, Sr. Jair Roberto Grenzel. demonstrou incredulidade quando da implantação da unidade de observação, pois achou os bulbilhos do material livre de vírus muito pequenos. Entretanto, ao fim do ensaio e após a análise, ele ficou extremamente animado com a perspectiva de obtenção de alho-semente livre de vírus de cultivares nobres como 'Caçador' e 'Quitéria'.

Além do peso total de bulbos ter sido maior, o numero e peso de bulbos nas classes 4 a 7 foi maior no material produzido à partir de alho livre de vírus.

2- Agência Rural- GO

Fez-se tentativa de se celebrar um Acordo de cooperação técnica com a Agência Rural visando à instalação de UVs do conceito de produção de alho-semente própria pelos produtores a partir de alho-semente livre de vírus, em Goiás. Propôs-se um Plano de Trabalho, que foi enviado completo à chefia em 6 de maio de 2000 para que tomasse as providências cabíveis. Posteriormente, foi elaborada uma minuta de contrato de cooperação técnica, que foi enviada à Diretoria Técnica da Agência Rural, em 6 de junho. Posteriormente, no dia 8 de junho recebeu-se de volta a minuta sem ajustes, sem sugestões de mudanças, e sem sinalização de aceitação dos termos do contrato apresentado, e portanto, o contrato não foi assinado entre as partes. Infelizmente pelo menos 4 UVs com a validação do conceito de produção de alho-semente pelos próprios produtores poderiam ter sido implementadas junto à aquela instituição.

3- EBDA

Foi implementada uma UV do conceito de produção de alho-semente livre de vírus da cv Amaranite junto a um produtor na região de Taquarendi/Mirangaba, Regional de Jacobina da EBDA. Foram produzidos 3,8 kg de alho-semente dentro do telado e 16 kg fora do telado (primeira multiplicação de alho-semente fora do telado). As quantidades de alho-semente plantadas originalmente foram: dentro do telado - 1.800 bulbilhos e fora do telado - 4.000 bulbilhos livres de vírus. As informações sobre os bulbilhos serão enviadas após a debulha

para o próximo plantio. Em 2002 informou-se que os bulbilhos apresentavam-se com baixo poder de brotamento (apenas de 5%).

4- EMCAPER-ES

Foi elaborado um plano de trabalho para implementação com a EMCAPER, e negociado em março de 2000. Por ele, foi instalada uma UV do conceito de produção própria de alho-semente na propriedade do Sr. Levi Espíndula, da localidade de Garrafão, município de Santa Maria do Jetibá-ES. Infelizmente o alho-semente plantado foi perdido, com baixa porcentagem de bulbificação no geral.

5- Prefeitura Municipal de Santa Maria do Jetibá-ES

Tentou-se estabelecer uma parceria com a Prefeitura Municipal daquele Município, importante produtor de alho do Estado do Espírito Santo. Elaborou-se o plano de trabalho detalhado, incluindo-se uma planta baixa para a construção de um telado municipal para multiplicação de alho-semente livre de vírus a partir do alho obtida na Embrapa Hortaliças. Infelizmente, as negociações demoraram demais, passou-se o período de plantio de alho na região, a EMCAPER recomendou à prefeitura que a atividade deveria ficar para o próximo ano. Após a nova eleição municipal que ocorreu em 2000, os contatos não foram mais mantidos com o Secretário de Agricultura do Município, pois o Secretário anterior havia deixado a nova administração.

6- EMATER-DF

Conjuntamente com a Unidade de Articulação Pesquisa Extensão-UEPE, da EMATER-DF, e com a participação do Dr. Romério José de Andrade, foi implementada uma UV do conceito de produção de alho-semente própria em sistema orgânico de produção de alho. O produtor cooperante foi o Engo. Agro. Joe Carlo V. Valle, com extensa experiência em agricultura orgânica no DF. Foram plantados 1.800 bulbilhos dentro de telado e 4.000 bulbilhos fora do telado (primeira multiplicação em campo) totalmente em sistema orgânico de produção. As produções não foram recuperadas até a elaboração do relatório, apesar dos pedidos e da insistência do escritório de articulação da EMATER na Embrapa Hortaliças.

7- Buritis, MG- Fazenda Celeste, propriedade do Dr. Nicolau Ayoagui

Em 2000 foi implantada uma Unidade de Validação do conceito de produção própria de alho-semente livre de vírus com isolamento no espaço. O objetivo era comparar a importância da distância de fontes de inóculo para isolamento de campos de produção de alho-semente livre de vírus. A área total compreendia 78,5 ha. Os resultados obtidos não foram animadores, pois apesar dos esforços de irrigação com uso de tratores e carretas, e outros cuidados por parte do nosso cooperador e membro da equipe técnica do projeto, as parcelas plantadas não apresentaram brotamento dos bulbilhos plantados. Pela uniformidade do problema de não-brotação, o problema pode ter sido causado por algum efeito residual de herbicida utilizado na cultura anterior- soja.

Em 2001 foram implementadas as seguintes Unidades de Validação do conceito de produção própria de alho-semente e resultados obtidos:

1- EBDA

Os 5.400 bulbilhos obtidos dentro do telado (aproximadamente 5 kg de bulbos) em 2000 foram novamente plantados dentro e foras do telado, para completar o primeiro ciclo de multiplicação fora do telado. Segundo os condutores (Unidade de Execução de Taquarendi/Miranga), os bulbilhos produzidos não apresentaram uma brotação satisfatória (apenas 5%), que eles atribuíram a baixa qualidade dos bulbilhos produzidos no ciclo anterior por eles terem tido um ciclo anormal, devido ao plantio tardio em 2000. Posteriormente todo o material produzido foi perdido.

Ainda em 2001, foram repassados 3.000 bulbos livres de vírus para plantio fora do telado. O plantio ocorreu em 31 de maio e a colheita em 10 de setembro. Foram colhidos aproximadamente 14 kg de bulbos curados, que foram armazenados para a continuidade dos trabalhos na safra de 2002.

2- Unidade de Validação do conceito de produção própria de alho a partir de alho-semente livre de vírus, propriedade do Sr. Edson Norio Tanabe.

Foi elaborado o Plano de Trabalho e repassados os bulbilhos de alho-semente livre de vírus da cv Amarante, e elaborado um convênio de Cooperação Técnica.

Infelizmente, o Sr. Edson Tanabe não mais manteve contato com a Embrapa Hortaliças, e nem o Sr. Péricles, estudante de pós-graduação da UNB/ Embrapa, que mantinha experimentos de sua tese na propriedade do Sr. Tanabe, com alho-semente livre de vírus, não mais conseguiu localizar o Sr. Tanabe, que se mudou de Brasília. Portanto, os dados podem ser considerados como perdidos para este relatório.

3- Instalação de três unidades piloto de multiplicação de alho-semente livre de vírus em condições fitossanitárias controladas, junto a comunidades de pequenos produtores de alho-consumo, período de abril de 1999 a dezembro de 2001:

Foi instalada uma Unidade junto a um produtor de alho de Damolândia- GO. O produtor obteve bulbos nos telados e demonstrou interesse nas multiplicações posteriores.

Metas programadas e alcançadas

As metas programadas versus as obtidas nos três anos do projeto foram:

Produção de antisoro policlonal de OYDV, LYSV e GCLV para uso em controle de qualidade na produção, para uso na técnica de ELISA; dezembro 1999.

Resultado - Foi obtido um antisoro específico para OYDV. Foi obtido também um novo antisoro policlonal polivalente. Meta executada em mais de 33%. Os demais antisoros não foram obtidos.

Identificação de vírus e seqüenciamento de genoma viral de no mínimo dois vírus novos em alho; dezembro de 2000.

Resultado - Meta alcançada.

Caracterizar molecularmente pelo menos dois vírus que ocorram no estado de São Paulo - dezembro de 1999.

Resultado - Não executado. Recursos financeiros da Embrapa não foram repassados em valores necessários e a tempo adequado para esta atividade;

Produção de sondas não radioativas para detecção de dois novos vírus adicionais em alho; dezembro de 2000.

Resultado - Meta parcialmente alcançada. Foram desenvolvidas sondas não radioativas para dois potyvirus e um carlavirus que haviam sido caracterizados em projeto anterior.

Adaptar pelo menos uma técnica molecular de diagnóstico de viroses em alho, dezembro de 2000.

Resultado - Meta alcançada.

Determinação da taxa de reinfecção em alho-semente livre de vírus e o efeito na produção e qualidade (tamanho) do alho-consumo, em três locais, dezembro 1999, 2000 e 2001.

Resultado - Meta alcançada- executado;

Obtenção de estoques iniciais de alho-semente livre de vírus, mínimo de 40 plantas por cultivar para as cvs Jonas, Quitéria e Hossan, dezembro de 1999.

Resultado - Meta não alcançada. Demorou-se mais do que o esperado na obtenção dos materiais iniciais.

Aumento do estoque de plantas livres de vírus da cv Caçador, com recuperação de no mínimo 300 plantas livres de vírus, anualmente, no período de 1999 a 2001.

Resultado - Meta não alcançada. Plantas existentes de Caçador foram perdidas na câmara-fria da Embrapa Hortaliças, por não bulbificarem, possivelmente por falta de estímulo por frio.

Foram também perdidas as plantas enviadas a E.N Canoinhas.

Aumento do estoque de plantas livres de vírus das cvs Jonas, Hossan e Quitéria, com obtenção de no mínimo 100 plantas anuais livres de vírus, no período de 2000 a 2001.

Resultado - Meta parcialmente alcançada em 88 %. Executado para Hozan, Chonan e Quitéria - foram obtidas em 2001 "in vitro" 86 microbulbos da cultivar Chonan, 102 microbulbos da cultivar Quitéria, 160 microbulbos da cultivar Hozan e 180 microbulbos da cultivar Caçador.

Obtenção de no mínimo 1.700 bulbos livres de vírus de cada cultivar (Jonas, Hossan e Quitéria) até o final do projeto, sendo por ano:

- 1999- 40 por cultivar;
- 2000- 340 por cultivar - Obtidas aproximadamente 800 para Hozan, 129 plantas da cv. Chonan e 272 da cv Quitéria.
- 2001- 1.700 por cultivar - Foram obtidos: 286 bulbos da cultivar Chonan, 207 bulbos da cultivar Quitéria e 20 bulbos da cultivar Branco de Mossoró

Resultado - Meta parcialmente alcançada. Demorou-se no processo de erradicação de patógenos via cultura de ápices caulinares.

Obtenção de no mínimo 26.300 bulbos livres de vírus da cultivar Caçador até o final do projeto, sendo por ano:

- 1999-1.000;
- 2000-5.300- os bulbilhos iniciais de Caçador foram perdidos como indicado acima;
- 2001-26.300;

Resultado - Meta não alcançada. Houve perda dos bulbilhos de alho livres de vírus.

Obtenção de no mínimo 400.000 bulbos livres de vírus da cultivar Amarante até o final do projeto, sendo por ano:

- 1999- 80.000- meta ultrapassada;
- 2000- 160.000- meta ultrapassada – aproximadamente 410.000 bulbilhos produzidos.;
- 2001- 160.000- meta ultrapassada- aproximadamente 400.000 bulbilhos foram produzidos;

Resultado - Meta ultrapassada, duas vezes e meia o programado em 2000 e 2001.

Elaboração de 6 trabalhos científicos completos para submissão à revistas indexadas, sendo 2 em dezembro de 2000 e 4 em dezembro de 2001.

Resultado - Meta alcançada em 50%. Publicação de um trabalho e submissão de outro e publicação de um livro. Alguns trabalhos científicos ainda aguardam publicação ou estão em fase de elaboração pela equipe.

Publicação de 5 Pesquisas em Andamento, sendo uma até outubro de 1999, duas até novembro de 2000 e duas até novembro de 2001.

Resultados - Meta não alcançada- não executadas. A equipe considerou que outras publicações eram mais importantes.

Apresentação de um total de 8 resumos em congressos de sociedades científicas, sendo dois até agosto de 1999, dois até agosto de 2000 e quatro até agosto de 2001.

Resultados - Meta ultrapassada. Foram apresentados 4 trabalhos em 2000. Foi apresentado 01 poster sobre Recuperação de plantas livres de vírus de alho, na Biolatina 2000, realizada em Buenos Aires em junho de 2000. Em 2001 foram apresentados 4 trabalhos científicos (resumos e posters) em congresso de sociedade científica.

Análise econômica das tecnologias de recuperação de plantas livres de vírus via cultura de ápices caulinares e multiplicação em condições fitossanitárias controladas, dezembro de 2000.

Resultados - Meta não alcançada. Não foi executado no projeto. A equipe considerou que há pouco espaço para uma empresa entrar no negócio de erradicação de vírus em alho, daí a pouca valia da análise de custos do processo.

Instalação de três unidades piloto de multiplicação de alho-semente livre de vírus em condições fitossanitárias controladas, junto a comunidades de pequenos produtores de alho-consumo, período de abril de 1999 a dezembro de 2001.

Resultados - Meta alcançada em 67 %. Foram instaladas duas- uma em Jacobina- BA e outra no DF;

Instalação de 25 unidades de validação de tecnologia ou de demonstração em condições reais de produção, sendo sete por ano, com metodologia de produção ou uso dos kits de indexação, ou com produção de alho-consumo a partir de alho-semente livre de vírus.

Resultados - Meta alcançada em 44 %. Em 1999 foram instaladas quatro unidades de observação; em 2000 foram instaladas cinco UVs e em 2001 foram instaladas duas UVs. As dificuldades encontradas no estabelecimento de parcerias foram bastante acima do esperado inicialmente.

Realizar pelo menos três dias de campo, com a apresentação de informações relativas ao uso da tecnologia de alho-semente livre de vírus.

Resultados - Meta realizada em 33%. Foi realizado um pela EBDA em 1999, com a presença de 22 produtores. Dificuldades no estabelecimento de parcerias.

Potencial de uso dos resultados obtidos

Os produtos obtidos e potenciais de uso dos mesmos seguem:

Antissoros produzidos – Serão úteis na detecção de vírus em trabalhos de controle de qualidade no processo de produção de alho-semente, na avaliação de introdução de materiais, em atividades de pesquisa etc.

Sondas produzidas - idem.

Informações científicas - serão úteis na implementação de projetos similares e no avanço do conhecimento científico no tema.

Material livre de vírus - servirão como material de propagação inicial para a obtenção de alho-semente a partir de material livre de vírus e a implementação do conceito de produção de alho-semente própria a partir de alho-semente livre de vírus.

Difusão de tecnologias, processos, produtos, serviços e conhecimentos e validação de resultados

- Palestra sobre Recuperação de plantas livres de vírus no curso internacional de “Sistemas de Micropropagação de Plantas”, patrocinado pelo CBAB, realizado no IPA em Recife, PE, no período de 10 a 23 de junho de 2000.

- Palestra sobre Recuperação de plantas livres de vírus no curso internacional de “Técnicas Avançadas de Micropropagação de Plantas”, patrocinado pelo CBAB, realizado no UFRPE, em Recife, PE, no período de 19 a 30 de novembro de 2001.

- Palestra sobre Recuperação de plantas livres de vírus no curso “Cultura de Tecidos de Plantas”, promovido pela Embrapa Hortaliças, no período de 29 de outubro a 01 de novembro de 2001.

- Aula de Recuperação de plantas livres de vírus no V Curso Internacional de Produção de Hortaliças, em 07 de novembro de 2000;

- Aula de Recuperação de plantas livres de vírus no VI Curso Internacional de Produção de Hortaliças, em 2001.

- Apresentação de poster sobre recuperação de plantas livres de vírus de alho na Biolatina 2000, em Buenos Aires, Argentina, no período de 26 a 28 de junho de 2000.

Publicações

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

FAJARDO, T.V.; NISHIJIMA, M.; BUSO, J.A.; TORRES, A.C.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Potyvirus and carlavirus naturally infectiog garlic plants in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*.

MELO FILHO, P. A.; NAGATA, T.; DUSI, A. N.; AVILA, A. C.; BUSO, J. A.; EIRAS, M.; RESENDE, R. O. Isolation and sequencing of Garlic mite-borne filamentous virus (GarMbFV) associated to garlic plants in Brazil. *Virus Reviews and Research*, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 159, 2001.

MELO FILHO, P. A.; TANABE, C. M. N.; DUSI, A. N.; TORRES, A. C.; AVILA, 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, n. 2, p.198, 2000.

MELO FILHO, P. A.; TANABE, C. M. N.; NAGATA, T.; DUSI, A. N.; AVILA, A. C.; BUSO, J. A.; RESENDE, R. O. Primeiro relato de *Allexivirus* associado a plantas de alho no Brasil In. 35 CBF E CONGRESSO DA ALF, 2001, São Pedro, SP Fitopatologia Brasileira, v. 26, p. 535, 2001. Suplemento.

MELO FILHO, P. A.; TANABE, C. M. N.; NAGATA, T.; DUSI, A. N.; AVILA, A. C.; BUSO, J. A.; RESENDE, R. O. Isolamento e sequenciamento de *Garlic virus C* (GarV-C), associado a plantas de alho no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 535, 2001. Suplemento.

MELO FILHO, P. de A.; TANABE, C.M.N.; NAGATA, T.; DUSI, A.N.; AVILA, A.C.; BUSO, J.A. Isolation and sequence of *garlic virus d* (GARV-D) associated to garlic plants in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 535, ago. 2001. Suplemento.

SIQUEIRA, W. J.; EIRAS, M.; TESSARIOLI NETO, J.; BUSO, J.A. Avaliação do comportamento de clones de alho livre de vírus e infecção por vírus no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, v.25, p.449, ago. 2000. Suplemento.

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

TANABE, C.M.N.; BUSO, J.A.; ÁVILA, A.C.; TORRES, A.C.; RESENDE, R. O. Produção de anti-soro polivalente e monitoramento da população de afídeos para determinação de reinfecção do alho semente (*Allium sativum* L.) em campo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.24, p.362, ago. 1999. Suplemento.

TANABE, C.M.N.; FAJARDO, T.V.M.; BUSO, J.A.; AVILA, A.C.; TORRES, A.C.; RESENDE, R. O. A degenerescência em campo causada por vírus na cultura do alho. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.24, p.362, ago. 1999. Suplemento. Resumo.

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*, v. 18, n.3, p. 192-194, 2000.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. Glossário de Biotecnologia Vegetal. Embrapa Hortaliças, 128p., 2000.

TORRES, A.C.; RESENDE, R.O.; DUSI, A.N.; FAJARDO, T.V.; BUSO, J.A. Protocolo de recuperação de plantas livres de vírus de alho via cultura de ápices caulinares e termoterapia. *ABCTP Notícias*, v.38, p.6-8, 2000.

Tecnologias, serviços e produtos

Subprojeto 1:

Foi desenvolvida a tecnologia de recuperação de plantas de alho livre de vírus mediante termoterapia a seco associada à cultura de ápices caulinares.

Subprojeto 2:

Foi produzido anti-soro para detecção específica de OYDV e detecção do complexo viral por um anti-soro polivalente.

Foram desenvolvidas sondas frias para detecção de OYDV, LYSV, GarCLV.

Estes produtos ainda não foram disponibilizados para uso externo uma vez que o sistema de indexação ainda está sendo complementado com o desenvolvimento de sondas para Allexivírus que será desenvolvido no projeto subsequente.

Avaliação geral

O projeto foi implementado com alguns problemas, principalmente no sub 03, do IAC em São Paulo, onde os repasses de recursos foram feitos em valores menores do que o acordado e em épocas inadequadas à realização dos trabalhos. Houve, também, dificuldade nas negociações realizadas para a implementação de trabalhos conjuntos com instituições estatais, ou mesmo condução deficiente por parte de cooperadores, o que prejudicou as metas do sub 05.

Todavia, os resultados obtidos nos demais componentes mostraram um avanço na parte de novos conhecimentos, a identificação de um grupo de vírus ainda não descritos anteriormente no país, a produção de antissoros, o seqüenciamento de diversos vírus, que são úteis para a confecção de primers e um incremento nos números de bulbilhos das cultivares trabalhadas para testes futuros. Uma grande perda para o projeto foram os bulbilhos, ou melhor, as plantas de "Caçador" que não bulbificaram em BSB e também em Canoinhas, obrigando ao reinício dos trabalhos de erradicação de viroses naquela cultivar.

Como recomendações:

- 1- O projeto deverá ser apresentado para uma nova fase, a III, agora com um maior foco nas atividades de validação das tecnologias já desenvolvidas, principalmente no conceito de produção própria de alho-semente a partir de alho-semente livre de vírus, com os bulbos de alho-semente livre de vírus da cv .Amarante.
- 1- Novas parcerias deverão ser continuamente procuradas, principalmente junto a associações de produtores, para trabalhos de validação e transferência de tecnologias.
- 3- Medidas para se ter outro técnico de nível médio treinado em trabalhos de extração de ápices caulinares e de multiplicação "in vitro" deverão ser tomadas, pois a saída do técnico atual poderá ocorrer em breve, por aposentadoria, o que será um fator de risco para a continuidade de trabalhos com alho na unidade.

Anexos

Tabela 3. 1. Homologia (% de identidade) da sequência de aminoácidos dos isolados do (A) onion yellow dwarf virus (OYDV-G), (B) leek yellow stripe virus (LYSV) e (C) garlic common latent virus (C) originados de diferentes regiões geográficas, Universidade de Brasília, Embrapa Hortaliças, 1999.

CDNA Clone ¹	OYDV _{BR}	OYDV _{AR1}	OYDV _{IND}	OYDV _{JP}	OYDV _{AR2}	OYDV _{UAE}
OYDV _{BR}	-					
OYDV _{AR1}	99.2	-				
OYDV _{IND}	96.5	95.7	-			(A)
OYDV _{JP}	96.1	95.3	97.7	-		
OYDV _{AR2}	96.1	95.3	96.5	96.5	-	
OYDV _{UAE}	95.0	94.2	98.5	96.1	95.0	-

	LYSV _{BR}	LYSV _{UAE}	LYSV _{CHI}	LYSV _{IND}	LYSV _L	LYSV _{JP}
LYSV _{BR}	-					
LYSV _{UAE}	88.6	-				
LYSV _{CHI}	88.6	88.6	-			(B)
LYSV _{IND}	86.2	85.9	86.9	-		
LYSV _L	85.9	84.8	85.8	95.5	-	
LYSV _{JP}	85.9	84.8	86.2	90.3	89.3	-

	GCLV _{BR}	GCLV ₁	GCLV ₂	GLV ₁	GLV ₂	GLV ₃
GCLV _{BR}	-					
GCLV ₁	94.5	-				
GCLV ₂	94.0	100.0	-			(C)
GLV ₁	53.7	54.3	54.3	-		
GLV ₂	53.2	52.5	52.5	91.9	-	
GLV ₃	53.2	52.5	52.5	91.9	99.3	-

Protocolo 1- Produção de anti-soros e execução de teste de ISEN e ELISA em alho.

a- PREPARAÇÃO DO PURIFICADO DO ALHO

Multiplicação dos vírus em plantas de alho na casa de vegetação e campo

↓

Folhas colhidas e congeladas à 82° C

↓

Trituração das folhas infectadas em tampão fosfato 0,2M, pH 8,0 + 0,5%, 2-mercapetanol + 0,01 M EDTA sódico. Retira-se o extrato que é coado com gase

↓

Centrifugação à 9000 g/30 min = coleta do sobrenadante

↓

Acrescenta ao sobrenadante 1% de triton x-100 e deixe agitar durante 3 horas a 4° C

↓

Centrifugação 8000 g/20 min = coleta do sobrenadante



Centrifugação do sobrenadante a 100.000 g / 3 horas em colchão de sacarose (30%) preparado em tampão citrato 0,05 M pH 6,2 = coleta do pellet



Pellet ressuspenso em 1 ml de tampão / 50 g de folhas, em agitação fria durante à noite



Centrifugação à 7000/10 min = coleta do sobrenadante



Centrifugação do sobrenadante à 40.000 rpm/ 3 horas em gradiente de CsCl (0,38/0,88/1,38 g de CsCl/ 1 mL de tampão citrato 0,01 M pH 6,2



Remoção da banda de vírus e diálise (3 vezes em tampão citrato 0,01 M pH 6,2).

b- LIMPEZA DO ANTI-SORO BRUTO

- 1) Colocar em dois tubos corex de 30 mL: 9mL de água destilada + 1 ml de anti-soro bruto e 10 ml de sulfato de amônia saturada;
- 2) Acrescentar lentamente o sulfato de amônia;
- 3) Deixar em repouso por 2 horas;
- 4) Ferver um pedaço de membrana para dialisar em água destilada + uma pitada de EDTA;
- 5) Centrifugar no rotor 20 a solução após 2 horas ⇒ 10.000 rpm / 10 minutos;
- 6) Retirar o sobrenadante e pegar o pellet, acrescentando 1 ml de PBS 0,5 e deixar dialisando em 1 l de PBS 0,5 por 3 horas. Em seguida repetir + uma vez 1l de PBS 0,5 por 3 horas e deixar dialisando por uma noite.
- 7) No dia seguinte o anti-soro deverá passar pela coluna (UA-5) absorbance/ microscopy centrifug. Acrescentando DEAE-SEPHACEL.

c- PREPARAÇÃO DO IgG CONJUGADO

- 1) Para 1 mL de IgG usar 2000 unidades de enzima;
- 2) Quantidade de IgG diluído;
- 3) Colocar num becker H₂O destilada e ferver um pedaço de tubo de diálise por 1 minuto;
- 4) Colocar 16 µl de enzima num Eppendorf novo e centrifugar por 10.000 / 3 minutos;
- 5) Retirar o sobrenadante;

- 6) Colocar 200 μ l de IgG diluído e misturar com o pellet, em seguida colocar num tubo de diálise;
- 7) Colocar no becker coberto 100 ml 0,5 PBS + 200 μ l de glutaraldeído 25 %;
- 8) Deixar em repouso por 4 horas no escuro;
- 9) Dialisar: colocar 1L de PBS 0,5 e deixar por 4 horas. Em seguida trocar novamente o PBS e deixar overnight;
- 10) Trocar o PBS 0,5 novamente e deixar mais 3 horas;
- 11) Acrescente BSA (albumina de boi) + azida sódica.

d- PREPARAÇÃO DAS TELINHAS DE COBRE PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Plantas de alho provenientes de cultura de tecidos, submetidas anteriormente à termoterapia, foram analisadas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), utilizando a técnica de ISEM (“immunosorbent electron microscopic”). Para a observação ao MET, fez-se necessária a preparação de telinhas de cobre com malha 200 (Sigma) com um filme de formvar a 0,6%, que serviram de suporte para as amostras. Para isso, uma lâmina de vidro, previamente limpa e desengordurada com acetona, foi mergulhada na solução de formvar dissolvida em clorofórmio. A seguir, promoveu-se a retirada das bordas do filme de formvar formado sobre a lâmina de vidro, sendo este colocado cuidadosamente sobre uma cuba com água, sendo, então, deslocado da lâmina. Após as telinhas de cobre terem sido colocadas uma a uma sobre o filme de formvar, promoveu-se a retirada das telinhas, já contendo o filme de formvar, com o auxílio de um papel de filtro. Após a secagem por 12 horas, a temperatura ambiente, as telinhas receberam, finalmente, uma cobertura de carbono no aparelho “Sputter coated”.

e- PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS FOLIARES PARA ISEM

Pequenas amostras de folhas de plantas de alho da cultivar Caçador, provenientes de cultura de tecidos mais termoterapia, supostamente sadias (livres de vírus), foram coletadas e resfriadas (para utilização nos próximos dias) ou congeladas a -20°C (para utilização posterior). As folhas (de cada amostra) foram maceradas em presença de tampão borato 0,05M pH 8,1 na proporção máxima de 1:10 (p:v). Os extratos foliares obtidos foram centrifugados em microtubo em microcentrífuga (Eppendorf) a 2000 rpm por 1 minuto, sendo o sobrenadante resultante utilizado como amostra para ser analisado em ISEM.

f- IMUNOMICROSCOPIA ELETRÔNICA (ISEM)

A técnica de ISEM, desenvolvida por Derrick (1973), se baseia no revestimento ou sensibilização das membranas das telinhas de cobre de microscopia eletrônica com antissoros específicos. Utiliza-se assim, como fase sólida a membrana das telinhas de microscopia eletrônica. Fazem-se contactar as telinhas primeiramente com antissoro específico para o vírus em estudo, e em seguida, com as amostras a testar. A telinha é lavada e contrastada com acetato de uranila 1%. Se este vírus estiver presente na amostra, os anticorpos aderidos à membrana vão fixar as partículas virais que são depois observados ao microscópio

eletrônico. Aplicando novamente os anticorpos específicos, será possível observar os anticorpos a rodearem as partículas virais, processo designado por decoração e que prova a especificidade da reação. As principais vantagens do ISEM são a grande sensibilidade, igual ou superior à da ELISA, e a rapidez com que se podem obter os resultados. Contudo, em comparação com ELISA, presta-se menos ao ensaio de grande número de amostras.

ISEM – “Immunosorbent electron microscopic”

As amostras foram preparadas para ISEM seguindo as seguintes etapas:

1. Telinha de cobre com filme de formvar mais carbono foi colocada por 10 minutos em contato com antissoro específico para o complexo viral na diluição de 1:500;
2. Após lavagem com tampão borato 0,05M pH 8,1, a telinha foi colocada em contato com extrato foliar (amostra a ser testada) por 30 minutos;
3. Após lavagem com tampão borato 0,05M pH 8,1, a telinha foi colocada em contato com antissoro específico para o complexo viral na diluição de 1:50 por 45 minutos;
4. Após lavagem com água destilada, a telinha foi colocada por 1 minuto em contato com acetato de uranila 1%;
5. Após secagem a temperatura ambiente por 12 h, as telinhas foram, finalmente, observadas ao microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 100C ou EM 109).

g- ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

Realizou-se teste de Elisa-Direto para detecção de vírus nas plantas de alho (cvs. Amaranite e Caçador) provenientes da cultura de tecidos, que estão na fase de multiplicação para produção de alho-semente. Estas plantas foram submetidas anteriormente à indexação por ISEM, não tendo sido constatado, anteriormente, nenhuma partícula viral. As plantas foram cultivadas durante três ciclos, em casa-de-vegetação. Também foram coletadas amostras de plantas no primeiro plantio em casa-de-vegetação, após o cultivo *in vitro*.

Metodologia

Foram coletadas amostras de folhas, preferencialmente as mais jovens, colocadas em saquinhos plásticos e identificadas. As amostras foram maceradas em um triturador elétrico, em presença de tampão PBS-Tween, procurando-se diluir o mínimo possível o extrato da planta.

h- ELISA DIRETO

1. Colocar nas cavidades da placa 150 µl de IgG diluído em tampão de revestimento;
2. Incubar a placa por 2 ou 4 horas a 37 °C;
3. Lavar 3 vezes com tampão PBS-T com intervalo de 3 minutos entre cada lavagem;
4. Colocar 100 µl de amostras diluída em PBS-T por orifício;
5. Incubar por uma noite em geladeira;
6. Lavar 3 vezes com tampão PBS-T com intervalos de 3 minutos entre cada lavagem;
7. Colocar nas cavidades da placa 100 µl de IgG-conjugado diluído em PBS-T;
8. Incubar por 2 ou 4 horas a 37 °C,
9. Lavar 4 vezes com tampão PBS-T,
10. Colocar o substrato em tampão de Dietanolamina, 150 µl por orifício;
11. Incubar a placa em ambiente escuro.

A reação positiva será visível a partir de 15 minutos após a adição do substrato, conforme o vírus e o antissoro usado, ou em algumas horas. A leitura da placa é feita em uma leitora de ELISA.

i- DoT-ELISA

Realizou o teste de DoT-ELISA para detectar se o material de alho Amaranthe infectado com os prováveis vírus do gênero Potyvirus e Carlavirus foram encontrados.

Metodologia

1. Macerar as amostras em tubos de ELISA colocando cerca de 0,05 g de amostra + 500 μ l PBS-T em cada tubo numerado inclusive os controles positivo e negativo;
2. Em seguida fazer a diluição 1:20 dessa amostras em cada tubos correspondente;
3. Colocar nas membranas 3 a 5 μ l com pipeta;
4. Bloquear as membranas com PBS-T com 2% de leite em pó;
5. Incubar por 1 hora agitando;
6. Colocar nas placas de petri o IgG 1:1000 + PBS-T com leite em pó. Deixar agitando por 3 horas;
7. Lavagem 3 min x 3 (PBS-T);
8. Colocar conjugado 1:1000. Deixar agitando por 1 hora (PBS-T);
9. Lavagem 3 min (PBS-T);
10. Colocar o substrato NBT-BCIP.

Recuperação de Plantas Livres de Vírus de Genótipo - Elite de Alho e sua Multiplicação em Condições Fitossanitárias Controladas. Relatório final do subprojeto 05.1999.025.01

Resumo

Sendo o alho uma espécie comercialmente propagada de forma vegetativa, há acúmulo de agentes causais de doenças importantes que são transmitidos de um ciclo de produção a outro, via bulbilho-semente contaminado. Dentre estas doenças estão as causadas por vírus. Há demanda do setor produtivo de alho para a obtenção de alho-semente de melhor qualidade fitossanitária, principalmente isento das principais viroses.

Este subprojeto tem como objetivos finais: a obtenção de plantas livres das principais viroses do alho nas cultivares Jonas, Hossan e Quitéria; a obtenção de estoques iniciais de alho-semente livre de vírus destas cultivares; o aumento dos estoques de alho-semente livres de vírus através da multiplicação em condições fitossanitárias controladas; a publicação de trabalhos científicos e de resumos em congressos de sociedades científicas, além de trabalhos de divulgação ; e analisar a viabilidade econômica da tecnologia de erradicação de viroses via cultura de ápices caulinares e multiplicações em condições fitossanitárias controladas.

De janeiro a dezembro de 1999 foram mantidos em casa de vegetação os estoques de plantas livres de vírus da cultivar Amaranthe. Também foi mantido in vitro um estoque de segurança de 300 plantas desse material.

Também foi validada a metodologia de recuperação de plantas livres de vírus para a cultivar Quitéria.

De janeiro a dezembro de 2000 desenvolveram-se as seguintes atividades:
Validação da metodologia de termoterapia - para as cultivares Hozan, Quitéria e Chonan com utilização da termoterapia de bulbilhos a seco, que associada a cultura de ápices caulinares, mostrou-se uma excelente técnica para produção de plantas de alho livres de vírus das referidas cultivares.

De janeiro a dezembro de 2001 desenvolveram-se as seguintes atividades:

Foram produzidos in vitro:

86 microbulbos da cultivar Chonan

102 microbulbos da cultivar Quitéria

160 microbulbos da cultivar Hozan

180 microbulbos da cultivar Caçador

Dos microbulbos produzidos em 2000 e plantados em telado no ano 2001 foram obtidos:

286 bulbos da cultivar Chonan

207 bulbos da cultivar Quitéria

20 bulbos da cultivar Branco de Mossoró

3. Foram produzidos 100 kg de bulbos da cultivar Amarante

Resultados, conclusões e recomendações

No período de desenvolvimento do projeto foram obtidos os resultados:
Desenvolvimento de metodologia visando a recuperação de plantas livres de vírus de alho.
Validação da metodologia de recuperação de plantas livres de vírus para as cultivares Caçador, Hozan, Chonan e Quitéria

A cultura de ápices caulinares é uma estratégia para o estabelecimento de estoques de plantas matrizes livres de vírus. Esse método baseia-se na premissa de que a concentração desse patógeno distribui-se não uniformemente na planta infectada. A estratégia consiste em reproduzir, *in vitro*, plantas a partir de tecidos pressupostamente livres de vírus (Murashige, 1974). Basicamente, a metodologia consiste na excisão da cúpula meristemática apical com um ou dois primórdios foliares (onde ainda não se observa conexão vascular com os tecidos da planta), podendo ser cultivada em meio nutritivo adequado para diferenciação e desenvolvimento dos sistemas caulinar e radicular. Várias hipóteses (nenhuma comprovada) foram utilizadas para explicar a eliminação de vírus via cultura de ápices caulinares. Provavelmente, há um ou mais mecanismos de inativação operando nas células meristemáticas em cultura, os quais eliminam vírus dos tecidos infectados (Stone, 1978). Também tem sido sugerido que a eliminação do vírus é consequência da modificação metabólica resultante da injúria causada aos tecidos no processo de excisão (Mellor & Stace-Smith, 1977). Outros sugerem que as substâncias reguladoras de crescimento presentes no meio de cultura podem estimular um mecanismo de resistência das células da planta (Antoniv *et al.*, 1981) ou que essas substâncias têm ação sobre os vírus durante o período de cultura dos ápices caulinares (Quak, 1961).

A associação de altas temperaturas com a cultura de tecidos tem aumentado a eficiência da recuperação de plantas livres de vírus, como por exemplo em alho (Conci & Nome, 1991). Em geral, a planta infectada é exposta a temperaturas entre 30 e 40°C por períodos de 4 a 6 semanas ou mais, dependendo do vírus a ser eliminado. Após esse tratamento, o explante é excisado e cultivado *in vitro*.

Este método tem sido usado desde 1889 para controle de doença viral em cana-de-açúcar (Kobus, 1990, citado por Quak, 1977). A eficácia desta técnica foi comprovada por Kassanis (1950), que observou o efeito benéfico da exposição de tubérculos de batata a alta temperatura na inativação do vírus do enrolamento das folhas (PLRV), doença de grande importância nessa hortaliça. Este tratamento é mais efetivo contra vírus isodiamétricos, *thread like* viroses e doenças causadas por micoplasma.

Tem sido postulado que, em alguns casos, altas temperaturas inativam o vírus; em outros, a multiplicação do vírus é inibida, ou ainda pode ocorrer uma redução na movimentação de partículas virais na planta infectada. Também tem sido proposto que a erradicação do vírus por altas temperaturas baseia-se no fato de que, como os processos de síntese e degradação do vírus ocorrem simultaneamente, em altas temperaturas a síntese viral é inibida enquanto

que a degradação continua (Kassanis, 1957). Entretanto, é de grande aceitação que a termoterapia não inativa o vírus, mas previne que ele infeccione as brotações desenvolvidas durante o tratamento.

Para a cultivar Amaranthe, aumento de produtividade de massa fresca dos bulbos foi acima de 100% e as plantas apresentaram excelente desenvolvimento vegetativo durante o ciclo da cultura, quando comparadas com as plantas infectadas.

Até dezembro de 2001 foram produzidos: 286 bulbos da cultivar Chonan; 207 bulbos da cultivar Quitéria; 20 bulbos da cultivar Branco de Mossoró e 100 kg de bulbos da cultivar Amaranthe.

Conclusões:

A cultura de ápices caulinares de alho associado a termoterapia é um método eficiente para produção de plantas livre de vírus

A tecnologia desenvolvida foi validada para as cultivares Hozan, Chonan e Quitéria e Caçador.

Difusão de tecnologias, processos, produtos, serviços e conhecimentos e validação de resultados

1. Palestra sobre Recuperação de plantas livres de vírus no curso internacional de "Sistemas de Micropropagação de Plantas", patrocinado pelo CBAB, realizado no IPA em Recife, PE, no período de 10 a 23 de junho de 2000.
2. Palestra sobre Recuperação de plantas livres de vírus no curso internacional de "Técnicas Avançadas de Micropropagação de Plantas", patrocinado pelo CBAB, realizado no UFRPE, em Recife, PE, no período de 19 a 30 de novembro de 2001.
3. Palestra sobre Recuperação de plantas livres de vírus no curso "Cultura de Tecidos de Plantas", promovido pela Embrapa Hortaliças, no período de 29 de outubro a 01 de novembro de 2001.
4. Aula de Recuperação de plantas livres de vírus no V Curso Internacional de Produção de Hortaliças, em 07 de novembro de 2000.
5. Aula de Recuperação de plantas livres de vírus no VI Curso Internacional de Produção de Hortaliças, em 2001.
6. Apresentação de poster sobre recuperação de plantas livres de vírus de alho na Biolatina 2000, em Buenos Aires, Argentina, no período de 26 a 28 de junho de 2000.

A obtenção de alho livre de vírus das cultivares Jonas e Hassan não foi possível, devido à falta de alho-semente de identidade genética confiável. Incluiu-se a cultivar Chonan nesse processo de produção de alho-semente com alta qualidade fitossanitária em substituição das cultivares Jonas e Hassan.

Publicações

FAJARDO, T.V.; NISHIJIMA, M.; BUSO, J.A.; TORRES, A.C.; AVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Garlic viral complex: identification of Potyviruses and Carlavirus in central Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, n.3, p.619-626, 2001.

TORRES, A.C.; DUSI, A.N.; BUSO, J.A. Produção de alho com alta qualidade fitossanitária mediante cultura de ápices caulinares. Brasília: Embrapa Hortaliças. Circular técnica.

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, v. 18, n.3, p. 192-194, 2000.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. Glossário de Biotecnologia Vegetal. Embrapa Hortaliças, 128p., 2000.

TORRES, A.C.; RESENDE, R.O.; DUSI, A.N.; FAJARDO, T.V.; BUSO, J.A. Protocolo de recuperação de plantas livres de vírus de alho via cultura de ápices caulinares e termoterapia. ABCTP Notícias, v.38, p.6-8, 2000.

Caracterização Molecular do Complexo Viral do Alho: Desenvolvimento de Sondas para Detecção dos Vírus do Complexo. Relatório final do subprojeto 05.1999.025.02

Resumo

O objetivo deste subprojeto foi caracterizar a variabilidade do complexo viral que ocorre na cultura do alho nas várias regiões produtoras do país.

Foram desenvolvidas sondas não radioativas para dois potyvirus e um carlavirus que já haviam sido caracterizados no projeto antecessor. No âmbito deste projeto, foram também isolados 4 diferentes espécies de Allexivirus. Destas espécies, três foram identificadas como *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV), *Garlic virus C* (GarV-C) e *Garlic virus D* (GarV-D). A identificação foi feita pela comparação da seqüência da capa protéica. Os trabalhos de desenvolvimento de sondas frias para os Allexivirus estão em andamento, priorizando-se uma sonda geral para o gênero e, posteriormente, sondas espécie-específicas.

Resultados, conclusões e recomendações

Descrever e discutir os dados obtidos, acumulados durante a execução do projeto ou subprojeto, fazendo uso, quando necessário de tabelas e gráficos.

Metodologia e resultados (2000/2001):

Purificação do complexo viral

O método para purificar o complexo viral usado foi adaptado de Assis (1994). Folhas de alho de várias cultivares naturalmente infectadas foram colhidas e submetidas à purificação.

Foi obtido o isolamento biológico do OYDV. O vírus foi purificado e um anti-soro específico foi produzido e encontra-se em uso por dot-Elisa em todas os processos de indexação visando a identificação de vírus.

Amplificação via PCR

Foi realizada a extração do RNA total do complexo viral a partir do método de Chomzynsky & Sacchi (1987). Para a síntese das fitas de DNA complementar (cDNA) utilizou-se como molde o RNA total. A partir das seqüências nucleotídicas já determinadas da capa protéica das espécies

de *Allexivirus* foram desenhados os oligonucleotídeos GVA, GVB, GVC e GVD conforme as recomendações presentes em artigos publicados.

Os oligonucleotídeos são complementares à fita viral (RNA senso positivo) e, desta forma, foram utilizados na síntese do cDNA, em reações independentes.

Para amplificar os fragmentos de DNA, definidos pelos pares de oligonucleotídeos referidos, foram formadas reações a partir de 10 μ l do cDNA, aos quais foram misturados 5 μ l de 2,5 mM dNTP (Gibco), 5 μ l de tampão da enzima 10X, 0,5 μ l de Taq DNA polimerase (5U/ μ l) (CENBIOT/RS) e 1 μ l de cada oligonucleotídeo (1 μ g/ μ l). O volume foi completado para 50 μ l com água esterilizada. Foram testadas dez combinações diferentes de oligonucleotídeos, que resultam na amplificação de fragmentos com diferentes tamanhos esperados.

As amostras foram submetidas à reação de PCR no termociclador "Gene Amp PCR System 2400" (PERKIN ELMER) com o ciclo de 94 °C por cinco minutos, passando a seguir por 35 ciclos, sendo cada um composto de desnaturação (94 °C / 1 min. 30 seg.), anelamento (55 °C / 2 min.) e extensão (72 °C / 1 min.). Concluídos os 35 ciclos, a temperatura permanecerá por 7 minutos a 72 °C para o término da extensão da Taq DNA polimerase.

Para a visualização da amplificação, 10 μ l de cada reação foram misturados a 2 μ l de tampão da amostra 6X (0,25% azul de bromofenol + 0,25% xileno cianole + 30% glicerol) e aplicados em gel de agarose 1,2%, para visualização de fragmentos de 335 bp (ou em agarose 1%, nos demais casos), preparado em tampão de corrida 0,5 X TBE (0,045 M Tris-HCl + 0,045 M ácido bórico + 1 mM EDTA, pH 8,0). As condições de corrida foram estabelecidas em 80 V. As bandas observadas, que apresentaram fragmento de tamanho esperado, foram recortadas do gel com uma lâmina, colocadas em eppendorfs e purificadas através da utilização do "Sephaglas™ Band Prep Kit" (Pharmacia), de acordo com as especificações do fabricante.

Produção de sonda e hibridização

Sonda não-radioativa

Clones de PCR e de cDNA foram digeridos e os insertos eluídos do gel pela utilização do "Sephaglas™ Band Prep Kit" (Pharmacia), e o DNA resultante foi utilizado diretamente na síntese das sondas, servindo como molde para os kits de produção de sondas não-radioativas (Dig labelling kit), os quais utilizam oligonucleotídeos randômicos, de acordo com as especificações do fabricante.

As membranas foram enroladas em tecido telado e colocadas dentro de garrafas, sendo incubadas em 25 ml de solução de pré-hibridização (SSC 4X + 0,1% SDS + 0,05% leite em pó desnatado + 40% formamida + 10 μ g/ml de DNA de esperma de salmão, fervido por três minutos). As membranas ficaram em forno giratório Mini 10 (Hybaid) por três horas, a 50 °C. A solução estoque de SSC 20X foi composta por 0,3 M citrato de sódio + 3 M NaCl, pH 7,0.

As membranas foram incubadas por 12 horas em forno regulado a 50 °C, com a sonda não-radioativa, previamente desnaturada a 95 °C por três minutos. As membranas passaram por duas lavagens, cada uma de 20 minutos, com SSC 2X e SSC 1X + 0,1% SDS. Após esta etapa, as membranas foram colocadas no cassete em contato com um filme de raio X (Kodak), revelado por passagens seqüenciais de, aproximadamente, três minutos cada, na solução reveladora, em água com ácido acético e no fixador.

No ano de 2000 tiveram início os estudos moleculares sobre *Allexivirus* com a detecção de plantas originadas do Gama/CNPH e de Água Fria-GO as quais apresentaram resultados sorológicos positivos. Tais resultados foram obtidos através do uso de 3 anti-soros monoclonais e 1 policlonal de *Allexivirus* oriundos do Japão.

Após a detecção foi realizada extração de RNA com uso do tampão isocianato de guanidina, das possíveis espécies de vírus denominadas de GarV-A, GarV-B, GarV-C e GarV-D. Como passo seguinte foram realizadas reações de RT-PCR para construção de cDNA através do uso de primers previamente desenhados com base em seqüências de capa protéica obtidas via internet dos isolados japoneses. Posteriormente foram obtidos clones com uso de células competentes de *Escherichia coli* e ligação dos respectivos insertos em plasmídeos de pGen-T Vector. De início dois isolados de 762 pb supostamente de GarV-A foram encaminhados à UFV cujos resultados revelaram apresentar 96,6 % de homologia de aminoácido e nucleotídeo com *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV), um vírus já classificado e só detectado até o momento na Argentina e em vias de publicação, porém, antes do sequenciamento já sugeria ser diferente do que fora isolado no Japão uma vez que a enzima Hind III não corta o isolado japonês ao meio e isso foi fato ocorrido com nosso suposto GarV-A.

Extração obtida de outra planta revelou reação sorológica negativa com os anti-soros de GarV-A, GarV-B e GarV-C. Tal isolado só reagiu positivamente com o anti-soro policlonal mixto de *Allexivirus*, e isso sugere ser este isolado de alguma espécie diferentes dos três primeiros a qual poderá ser o próprio GarV-D ou algo diferente desse.

Em 2001, foram encaminhados ao Instituto Biológico para seqüenciamento clones de GarV-C e GarV-D. Nosso possível GarV-C (781 pb) revelou 95 % de similaridade de aminoácido e 92,3 % de nucleotídeo com o GarV-C japonês e nosso GarV-D (753 pb) revelou 92,6 % de homologia de nucleotídeo e 96,8 % de aminoácido com o GarV-D japonês.

Clones de GarV-B foram encaminhados à UnB para seqüenciamento como também uma banda de aproximadamente 400 pb obtida com um par de primer universal desenhado para detectar todos os *Allexivirus* de alho.

Os clones de GarV-B deram resultados negativos devendo o trabalho continuar ao final do segundo semestre de 2001.

Em 2001, foi seqüenciado o gene completo da capa protéica de duas espécies de *Allexivirus*. *Garlic virus C*, com 781 pb, apresentando 92,3% de similaridade de nucleotídeos e 95% de similaridade de aminoácidos com o GarV-C japonês encontrado no GenBank. *Garlic virus D*, com 753 pb, apresentando 92,6% de similaridade de nucleotídeos e 96,8% de similaridade de aminoácidos com o GarV-D japonês encontrado no GenBank. Obtenção e seqüenciamento de uma banda de 459 pb que revelou homologia de 95% com GarV-C

Com os dados de seqüência, os trabalhos de desenvolvimento de sondas para *Allexivirus* serão iniciados no âmbito do projeto 05.2002.001, que se iniciou em janeiro de 2002.

Publicações

Durante todo o trabalho, alguns resumos foram encaminhados a eventos científicos, os quais podem ser vistos a seguir:

MELO FILHO, P. A.; NAGATA, T.; DUSI, A. N.; AVILA, A. C.; BUSO, J. A.; EIRAS, M.; RESENDE, R. O. Isolation and sequencing of Garlic mite-borne filamentous virus (GarMbFV) associated to garlic plants in Brazil. *Virus Reviews and Research*, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 159, 2001.

MELO FILHO, P. A.; TANABE, C. M. N.; NAGATA, T.; DUSI, A. N.; AVILA, A. C.; BUSO, J. A.; RESENDE, R. O. Primeiro relato de Allxivirus associado a plantas de alho no Brasil In. 35 CBF E CONGRESSO DA ALF, 2001, São Pedro, SP Fitopatologia Brasileira, v. 26, p. 535, 2001. Suplemento.

MELO FILHO, P. A.; TANABE, C. M. N.; NAGATA, T.; DUSI, A. N.; AVILA, A. C.; BUSO, J. A.; RESENDE, R. O. Isolamento e sequenciamento de Garlic virus C (GarV-C), associado a plantas de alho no Brasil. Fitopatologia Brasileira, v. 26, p. 535, 2001. Suplemento.

Tecnologias, processos, produtos, serviços e conhecimentos e validação de resultados

Foi produzido anti-soro para detecção específica de OYDV e detecção do complexo viral por um anti-soro polivalente.

Foram desenvolvidas sondas frias para detecção de OYDV, LYSV, GarCLV.

Estes produtos ainda não foram disponibilizados para uso externo uma vez que o sistema de indexação ainda está sendo complementado com o desenvolvimento de sondas para Allxivirus que será desenvolvido no projeto subsequente.

Estudo da Degenerescência por Virose na Cultura do Alho em Diversas Regiões do País. Relatório final do subprojeto 05.1999.025.03

Resumo

Em 1999 foram conduzidos dois ensaios, um em Água Fria (GO) e outro em Brasília (DF). Em 2000 os ensaios foram repetidos e um terceiro acrescentado, conduzido em Buritis, (MG). Os resultados vêm indicando a viabilidade do uso do alho como semente ainda na quarta ou quinta exposição quando comparado com o alho semente comercial.

No ano de 2001, deu-se continuidade aos ensaios de degenerescência em Brasília e Buritis. Foi conduzido um ensaio para determinação da distância e direção da disseminação de vírus no alho. Pode-se concluir que os vírus que infectam a cultura do alho se disseminam próximo à fonte de inóculo. Foi conduzido um ensaio para acompanhamento da curva de progresso de doença, utilizando-se sorologia para acompanhar a disseminação geral e de *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) e *Leek yellow stripe virus* (LYSV). O OYDV é prevalente sobre o LYSP, porém os dois vírus se disseminam rapidamente quando sob alta pressão de inóculo.

Resultados, conclusões e recomendações

Em 2000, Foram conduzidos três ensaios para avaliar a degenerescência de alho livre de vírus, cv. Amaranthe, em condições de campo. Em Água Fria (GO) e na Embrapa Hortaliças, o ensaio foi composto de seis tratamentos, a saber: 1, alho livre de vírus; 2 a 5, alho com 1, 2, 3 e 4 exposições a campo em anos anteriores; 6, alho semente comercial. Em Buritis (MG) foi instalado o primeiro ano do experimento, com apenas dois tratamentos: alho livre de vírus e alho-semente comercial.

Água Fria e Embrapa Hortaliças: Foi avaliada a produção total. O alho livre de vírus produziu significativamente mais que os demais tratamentos, e o alho-semente comercial produziu significativamente menos que os demais tratamentos. Tratamentos 2 a 5 não diferiram entre si. Entretanto, esta é uma análise preliminar. Uma análise de regressão com alho colhido e classificado está em andamento. Análise de infecção está em andamento, sendo executada por um estudante de doutorado da Universidade de Brasília.

Buritis: O alho livre de vírus apresentou produção total significativamente superior ao controle. Apresentou também número de bulbos de classes superiores maior que o alho-semente comercial. Ao fim do ensaio, o alho livre de vírus apresentou 10% de infecção e o

controle 97% de infecção. A avaliação realizada por dot-Elisa é qualitativa. Observa-se, entretanto, uma reação mais fraca nas amostras originárias de alho livre de vírus, indicando que a concentração de vírus é menor ou a composição de espécies que estão infectando as plantas é diferente entre os tratamentos.

Em 2001, os ensaio de Brasília e Buritit foram repetidos. Nos dois ensaios foi acrescentada mais uma geração. As tabelas abaixo apresentam o resultado consolidado do experimento de Brasília, DF.

Tabela 1. Produção e ganho de produção de plantas de alho após seis exposições a campo ao complexo viral

Tratamento	Produtividade	Ganho de
	t/ha	Produção %
1ª exp.	10,5 a	103
2ª exp.	9,0 a	72
3ª exp.	8,0 b	50
4ª exp.	7,0 b	38
5ª exp.	6,0 bc	17
6ª exp.	6,5 bc	33
Agric.	5,0 bcd	—

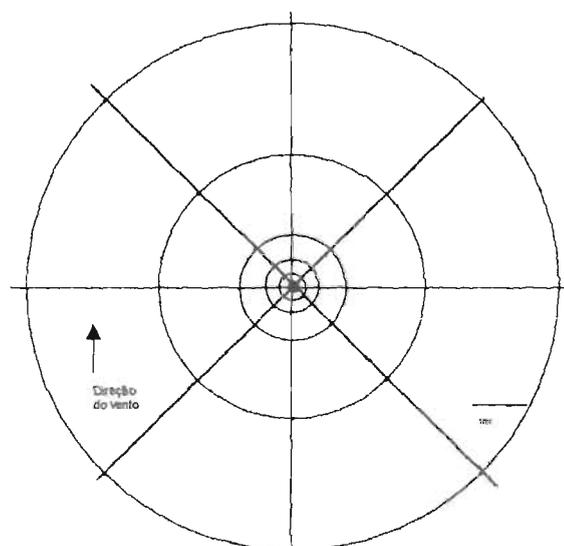
Tabela 2. Classificação comercial de bulbos de alho após seis exposições a campo ao complexo viral

Tratamento	Classes	
	1 a 3	4 a 7
1ª exp.	14	86
2ª exp.	26	74
3ª exp.	28	72
4ª exp.	35	65
5ª exp.	71	29
6ª exp.	77	33
Agric.	76	24

Tabela 3. Altura média de plantas de alho expostas a campo ao complexo viral

Tratamento	Altura (cm)
1ª exp.	57,73
2ª exp.	51,57
3ª exp.	49,20
4ª exp.	49,59
5ª exp.	47,96
6ª exp.	49,10
Agric.	41,82

Em Buritit, devido a problemas na condução do pivô central onde o ensaio foi implantado, houve uma condição forte de estresse, ocasionando uma baixa produtividade. Entretanto mesmo sob estas condições, as parcelas livre de vírus e com uma exposição a campo apresentaram produtividades em torno de 5,5 t/ha, enquanto o controle apresentou uma média de 1,8. Foi possível obter sementes para continuidade do ensaio no ano de 2002. Foi implantando um ensaio para determinação da distância e direção de disseminação de vírus no alho. O delineamento é ilustrado na figura abaixo:



Croqui do experimento para estudos epidemiológicos de vírus em alho-semente em condições de campo.

O ensaio foi implantado em uma área 1000 m distante de áreas de produção de alíáceas. O objetivo do ensaio foi verificar:

- 1- qual a distância que diferentes vírus se disseminam à partir da fonte de inóculo;
- 2- qual o efeito da direção predominante do vento na degenerescência do alho-semente;
- 3- quais espécies de vírus são preferencialmente transmitidas em condições de campo.

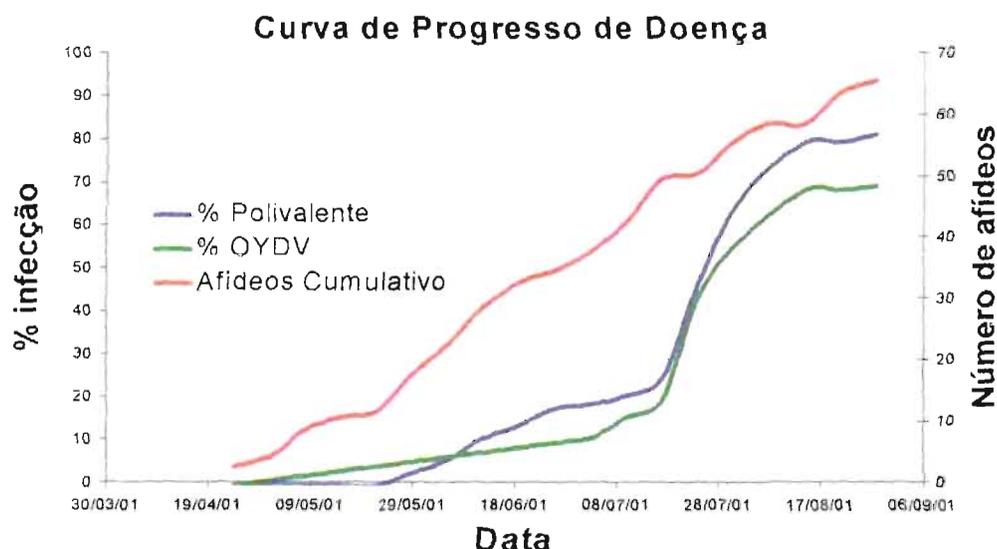
O experimento constituiu-se de uma área circular de cinco metros de raio (aproximadamente 79 m²), plantado com bulbos de alho com alto nível de infecção por vírus (independente de cultivar), circundada por parcelas de 2 m² distribuídas radialmente em 8 raios a N, NE, L, SE, S, SO, O e NO. As parcelas distaram 3,5; 5,5; 8,5; 18,5 e 30,0 m do centro da fonte de inóculo.

O experimento foi conduzido sem pulverizações e toda área foi mantida livre de plantas daninhas ao longo do experimento. O experimento foi conduzido por cerca de 150 dias (ciclo médio da cultura). Ao final do período, as parcelas foram colhidas individualmente. Os bulbos produzidos foram amostrados ao acaso, 10% (20 bulbos/parcela), e foram indexados por Dotblot-Elisa utilizando-se anti-soros policlonais específicos para os vírus OYDV, LYSV, e anti-soro polivalente para o complexo viral do alho. Não foi observado efeito de direção. Os índices de infecção observados para cada raio foram:

raio 1: OYDV: 5,0%; LYSV: 3,8%; Polivalente: 6,25%
raio 2: OYDV: 2,5%; LYSV: 0; Polivalente: 2,5%
raio 3: OYDV: 0; LYSV: 0; Polivalente: 0
raio 4: OYDV: 0; LYSV: 0; Polivalente: 0
raio 5: OYDV: 0,6%; LYSV: 0,6%; Polivalente: 0,6%

O ensaio será repetido em 2002 para confirmação dos resultados. Entretanto pode-se obter um forte indicativo de que a distância predominante de disseminação é menor que 5 m e que a distribuição espacial dos vírus que infectam o alho, predominantemente vírus de transmissão com relação do tipo não persistente, acompanham o padrão comum a potyvirus, que concentram-se em um curto raio da fonte de inóculo. Isso abre uma perspectiva de localização de áreas de produção de sementes dentro de propriedades onde o alho é cultivado comercialmente, apenas com um isolamento adequado.

Foi implantado no meio de um campo de alho de 2 ha um ensaio para acompanhar o desenvolvimento da epidemia de vírus em alho. Foram plantadas cinco parcelas de 2 m² de alho livre de vírus, com 200 plantas por parcela. Destas, 20 foram marcadas e, semanalmente, uma amostra da folha expandida mais nova foi coletada e levada ao laboratório para ser testada por dot-Elisa com anti-soro polivalente e contra OYDV. Uma armadilha de bandeja verde com água foi colocada no meio do ensaio e os afídeos nela capturados foram contados semanalmente. O resultado é apresentado na figura a seguir.



Há um indicativo de que o OYDV é prevalente. Entretanto, o experimento será repetido em outra oportunidade para confirmação dos resultados, desta vez utilizando outros anti-soros vírus específicos.

Publicações

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

MELO FILHO, P. A.; TANABE, C. M. N.; DUSI, A. N.; TORRES, A. C.; AVILA, 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, n. 2, p. 198, 2000.

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

TANABE, C.M.N.; BUSO, J.A.; AVILA, A.C.; TORRES, A.C.; RESENDE, R. O. Produção de anti-soro polivalente e monitoramento da população de afídeos para determinação de reinfecção do alho semente (*Allium sativum* L.) em campo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.24, p.362, ago. 1999. Suplemento.

TANABE, C.M.N.; FAJARDO, T.V.M.; BUSO, J.A.; AVILA, A.C.; TORRES, A.C.; RESENDE, R. O. A degenerescência em campo causada por vírus na cultura do alho. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.24, p.362, ago. 1999. Suplemento. Resumo.

Tecnologias, serviços e produtos

Baseado nos resultados dos ensaios de degenerescência, uma proposta de um sistema de produção própria de alho semente de alta qualidade fisiológica e sanitária está sendo

estruturado, no âmbito do subprojeto 5 deste projeto, para ser executado à partir de 2002 no novo projeto que substituirá o atual.

Avaliação global do andamento

Os resultados deste subprojeto, em conjunto com os resultados dos demais subprojetos permitem-nos sugerir que sua continuidade em um novo projeto trará um grande benefício aos produtores de alho. Considerando que se conseguiu trabalhar, até o momento, com uma cultivar de alho seminobre, as ações de validação que serão propostas atingirão, numa primeira etapa, produtores de agricultura familiar e produtores orgânicos.

Situação geral do subprojeto até a programação: concluído.

Ações de Validação e Difusão de Tecnologias em Alho-Semente Livre de Vírus. Relatório final do subprojeto 05.1999.025.05

Resumo

Os resultados de experimentos obtidos em condições de estações experimentais representam, na maioria das vezes, protótipos de tecnologias, pois as condições controladas da realização dos experimentos, não refletem todos os fatores que poderão influenciar positiva ou negativamente o comportamento das mesmas em condições reais de produção. Neste subprojeto foram implementadas unidades de observação, de validação e de demonstração, visando se obter tecnologias acabadas, contando com a participação de parte da clientela no processo. Além disso, se objetivou avaliar um conceito de sistema de produção de alho-semente livre de vírus por parte de pequenos produtores de alho-consumo, de forma a torná-los independentes de obtenção externa de material de multiplicação com qualidade fitossanitária adequada.

No ano de 1999 foram instaladas 2 Unidades de Observação, nos seguintes locais; Boninal e Bom Jesus da Lapa- BA, com os seguintes resultados Boninal- área de 40 m², com produtividades de 4 t/ha para o material plantado com alho-semente com duas gerações de exposição em campo em Brasília vs 2 t / ha com plantio de alho-semente comumente utilizado pelo produtor (contaminado)- parceria EBDA, Já para o de Bom Jesus da Lapa os resultados foram, respectivamente, de 3t / ha e 1,5 t / ha, para uma área de 25m², trabalho realizado em parceria com a CODEVASF. Ainda em 1999 foram instaladas quatro Unidades de Observação de alho- cv Amarante livre de vírus. Duas foram instaladas no Município de Mirangaba e duas na localidade de Caatinga de Moura, Município de Jacobina. Estiveram participando 22 pequenos produtores rurais dos dois municípios.

No ano de 2000 foram implementadas 5 Unidades de Validação, sendo quatro do conceito de produção própria de alho- semente, envolvendo produtores de Burutis-MG, Taquarendi/Miranga, BA, Santa Maria do Jeribá-ES, e Distrito Federal. A última UV foi instalada junto a um produtor de alho no sistema orgânico. O alho livre de vírus produziu 140% mais que o alho produzido a partir de alho-semente contaminado. Em 2001 foi implementada uma Unidade de validação do conceito de produção própria de alho-semente a partir de alho-semente livre de vírus no Município de Taquarendi-BA). Os materiais produzidos em 2000 foram todos perdidos, segundo os condutores porque foram produzidos fora da época normal na ano anterior. Os repassados para plantio na primeira exposição fora do telado produziram, a partir de 3.000 bulbilhos, 14 kg de bulbos curados, que serão utilizados na continuação dos trabalhos em 2002. Outra Unidade foi implementada no Município de

Água Linda, GO, junto a um produtor tradicional de alho-consumo, mas os dados não foram recuperados para o presente relatório. O subprojeto ficou aquém das expectativas iniciais, pois muitas dificuldades foram encontradas no estabelecimento de parcerias tanto com instituições governamentais (Estado e município) como com produtores privados.

Resultados, conclusões e recomendações

As metas originais e os resultados obtidos foram:

1- Instalação de 7 Unidades de Observação ou de Validação ou de Demonstração de tecnologia em condições reais de produção por ano, com metodologia de produção de alho-consumo a partir de alho-semente livre de vírus;

Período março a dezembro de 1999, 2000, 2001:

Em 1999 foram instaladas 2 Unidades de Observação, nos seguintes locais; Boninal e Bom Jesus da Lapa- BA, com os seguintes resultados Boninal - área de 40 m², com produtividades de 4 t/ha para o material plantado com alho-semente com duas gerações de exposição em campo em Brasília vs 2 t / h com plantio de alho-semente comumente utilizado pelo produtor (contaminado)- parceria EBDA, Já para o de Bom Jesus da Lapa os resultados foram, respectivamente, de 3t / ha e 1,5 t / ha, para uma área de 25m², trabalho realizado em parceria com a CODEVASF.

Ainda em 1999 foram instaladas quatro Unidades de Observação de alho- cv Amarante livre de vírus. Duas foram instaladas no Município de Mirangaba e duas na localidade de Caatinga de Moura, Município de Jacobina. Estiveram participando 22 pequenos produtores rurais dos dois municípios.

Em 2000 foram instaladas Unidades de validação nos seguintes locais e resultados obtidos: Buritis, MG- Fazenda Campininha, propriedade do Dr. Nicolau Ayoagui Foi implementada uma Unidade de Validação com alho-semente livre de vírus, comparando-se com o alho-semente utilizado por produtores, contaminado. Foram plantados 10 blocos com 4 m² de alho, cultivar Amarante livre de vírus e 10 blocos semelhantes com alho-semente normalmente utilizado por produtores, para comparação da produção. Área plantada –80 m². Resultados: parcelas alho-semente livre de vírus- 24,45 kg, parcelas com alho-semente similar ao utilizado pelos produtores- 10,51 kg. Incremento de 132,6 % sobre o alho comum utilizado pelo produtor.

Comentários Gerais:

O responsável pela lavoura, o Sr. Jair Roberto Grenzel demonstrou incredulidade quando da implantação da unidade de observação, pois achou os bulbilhos do material livre de vírus muito pequenos. Entretanto, ao fim do ensaio e após a análise, ele ficou extremamente animado com a perspectiva de obtenção de alho-semente livre de vírus de cultivares nobres como 'Caçador' e 'Quitéria'.

Além do peso total de bulbos ter sido maior, o número e peso de bulbos nas classes 4 a 7 foi maior no material produzido à partir de alho livre de vírus.

Agência Rural- GO

Fez-se uma tentativa de se celebrar um Acordo com a Agência Rural visando a instalação de UVs em Goiás. Propôs-se um Plano de Trabalho, que foi enviado completo à chefia em 6 de maio de 2000 para que tomasse as providências cabíveis. Posteriormente, foi elaborada uma minuta de contrato de cooperação técnica, que foi enviada à Diretoria Técnica da Agência

Rural, em de 6 de junho. Posteriormente, no dia 8 de junho recebeu-se de volta a minuta sem ajustes e o contrato não foi assinado entre as partes. Infelizmente pelo menos 4 UVs com a validação do conceito de produção de alho-semente pelos próprios produtores poderiam ter sido implementadas junto à aquela instituição.

EBDA

Foi implementada uma UV do conceito de produção de alho-semente livre de vírus da cv Amarante junto a um produtor na região de Taquarendi/Mirangaba, Regional de Jacobina da EBDA. Foram produzidos 3,8 kg de alho-semente dentro do telado e 16 kg fora do telado (primeira multiplicação de alho-semente fora do telado). As quantidades de alho-semente plantadas originalmente foram : dentro do telado- 1.800 bulbilhos e fora do telado - 4.000 bulbilhos livres de vírus. As informações sobre os bulbilhos serão enviadas após a debulha para o próximo plantio. Em 2002 informou-se que os bulbilhos apresentavam-se com baixo poder de brotamento (apenas de 5%).

EMCAPER-ES

Foi elaborado um plano de trabalho para implementação com a EMCAPER, e negociado em março de 2000. Por ele, foi instalada uma UV do conceito de produção própria de alho-semente na propriedade do Sr. Levi Espíndula, da localidade de Garrafão, município de Santa Maria do Jetibá-ES. Infelizmente o alho-semente plantado foi perdido, com baixa porcentagem de bulbificação no geral.

Prefeitura Municipal de Santa Maria do Jetibá- ES

Tentou-se estabelecer uma parceria com a Prefeitura Municipal daquele Município, importante produtor de alho do Estado do Espírito Santo, elaborou-se o plano de trabalho detalhado para a construção de um telado municipal para multiplicação de alho-semente livre de vírus a partir do alho obtida na Embrapa Hortaliças. Infelizmente, as negociações demoraram passou o período de plantio de alho na região, ficando para o próximo ano. Após a nova eleição municipal que ocorreu em 2000, os contatos não foram mais mantidos com o Secretário de Agricultura do Município.

EMATER-DF

Conjuntamente com a Unidade de Articulação Pesquisa Extensão-UEPE, da EMATER-DF, e com a participação do Dr. Romério José de Andrade, foi implementada uma UV do conceito de produção de alho-semente própria em sistema orgânico de produção de alho. O produtor cooperante é o Engo. .Agro. Joe Carlo V. Valle, com extensa experiência em agricultura orgânica no DF. Foram plantados 1.800 bulbilhos dentro de telado e 4.000 bulbilhos fora do telado (primeira multiplicação em campo) totalmente em sistema orgânico de produção. As produções não foram recuperadas, apesar dos pedidos e da insistência do escritório de articulação da EMATER na Embrapa Hortaliças.

Buritis, MG- Fazenda Celeste, propriedade do Dr. Nicolau Ayoagui

Em 2000 foi implantada uma Unidade de Validação do conceito de produção própria de alho-semente livre de vírus com isolamento no espaço. O objetivo era comparar a importância da distância de fontes de inóculo para isolamento de campos de produção de alho-semente livre de vírus. A área total compreendia 78,5 ha. Os resultados obtidos não foram animadores, pois apesar dos esforços de irrigação com uso de tratores e carretas, e outros cuidados por parte do nosso cooperador e membro da equipe técnica do projeto, as parcelas plantadas não apresentaram brotamento dos bulbilhos plantados. Pela uniformidade do problema de não brotação, o problema pode ter sido causado por algum efeito residual de herbicida utilizado na cultura anterior - soja.

Em 2001 foram implementadas as seguintes Unidades de Validação do conceito de produção própria de alho-semente e resultados obtidos:

EBDA

Os 5.400 bulbilhos obtidos dentro do telado (aproximadamente 5 kg de bulbos) em 2000 foram novamente plantados dentro e foras do telado, para completar o primeiro ciclo de multiplicação fora do telado. Segundo os condutores (Unidade de Execução de Taquarendi/Miranga), os bulbilhos produzidos não apresentaram uma brotação satisfatória (apenas 5%), que eles atribuíram a baixa qualidade dos bulbilhos por eles terem tido um ciclo anormal, devido ao plantio tardio em 2000. Posteriormente todo o material foi perdido. Ainda em 2001, foram repassados 3.000 bulbos livres de vírus para plantio fora do telado. O plantio ocorreu em 31 de maio e a colheita em 10 de setembro. Foram colhidos aproximadamente 14 kg de bulbos curados, que foram armazenados para a continuidade dos trabalhos na safra de 2002.

Unidade de Validação do conceito de produção própria de alho a partir de alho-semente livre de vírus, propriedade do Sr. Edson Norio Tanabe.

Foi elaborado o Plano de Trabalho e repassados os bulbilhos de alho-semente livre de vírus da cv Amarante, e elaborado um convênio de Cooperação Técnica.

Infelizmente o Sr. Edson Tanabe não mais manteve contato com a Embrapa Hortalicas, e nem o Sr. Péricles, estudante de pós-graduação da UNB/ Embrapa, que mantinha experimentos de sua tese na propriedade do Sr. Tanabe, com alho-semente livre de vírus, não mais conseguiu localizar o Sr. Tanabe, que se mudou de Brasília. Portanto, os dados podem ser considerados como perdidos para este relatório.

Instalação de três unidades piloto de multiplicação de alho-semente livre de vírus em condições fitossanitárias controladas, junto a comunidades de pequenos produtores de alho-consumo, período de abril de 1999 a dezembro de 2001.

Foi instalada uma Unidade junto a um produtor de alho de Damolândia- GO. O produtor obteve bulbos nos telados e demonstrou interesse nas multiplicações posteriores.

Metas planejadas e executadas

1- Instalação de 7 Unidades de Observação ou de Validação ou de Demonstração de tecnologia em condições reais de produção por ano, com metodologia de produção de alho-consumo a partir de alho-semente livre de vírus;

período março a dezembro de 1999, 2000, 2001:

Resultados: Foram instaladas 11 Unidades de validação ou de observação

2 - Instalação de três unidades piloto de multiplicação de alho-semente livre de vírus em condições fitossanitárias controladas, junto a comunidades de pequenos produtores de alho-consumo, período de abril de 1999 a dezembro de 2001:

Resultados: foi instalada uma unidade.

Avaliação final global

O subprojeto teve problemas na implementação de Unidades de Validação tanto junto a parceiros estatais como privados. Como se trata de um projeto de vários ciclos de plantio, há

a necessidade de se ter bem claras as responsabilidades e acordos assinados entre as partes, o que está acarretando dificuldades no estabelecimento de parcerias.

Das 21 Unidades previstas foram implementadas 11, mas no aspecto qualitativo poucas informações foram coletadas. Todavia, foram observadas que as produtividades podem ser maiores quando se utilizaram alho-semente originalmente livre de vírus. Em um local, Buritis de Minas- MG, dentro de um sistema intensivo de produção de alho- consumo, a produtividade do alho produzido a partir de alho-semente livre de vírus foi de 132,6% superior ao produzido a partir de alho-semente similar ao utilizado pelos produtores, mesmo quando os bulbilhos utilizados tenham sido de menor tamanho.

As recomendações seguem:

Em uma nova fase de projeto similar, estas atividades têm que continuar. Sem a validação em condições reais não se tem uma tecnologia acabada, e portanto, as possibilidades de adoção serão menores ou nulas.

Municípios importantes de produção de alho e que ainda se interessem pela cv Amarante seriam alvos preferenciais de novas atividades nesta linha de P&D.

Os instrumentos jurídicos deveriam ser reavaliados e tornados os mais simples possíveis, para que os produtores e mesmo instituições estatais não oponham obstáculos a realização de trabalhos conjuntos.

Difusão de tecnologias, processos, produtos, serviços e conhecimentos e validação de resultados

O subprojeto é basicamente de validação e difusão de tecnologia. Nos resultados estão especificados o que, como, onde e para quem tentou-se realizar as atividades programadas.