

635.26
D973d
2005

Desenvolvimento de Tecnologia de Produção de Alho - Semente Livre de Vírus – Fase III



Desenvolvimento de tecnologia
2005 LV-2005.089



30815-1

635.26
D973d
2005
LV-2005.089

Embrapa

República Federativa do Brasil
Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Conselho de Administração
Luís Carlos Guedes
Presidente

Sílvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Hélio Tollini
Ernesto Paterniani
Cláudia Assunção dos Santos Viegas
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa
Sílvio Crestana
Diretor-Presidente

Tatiane Deane de Abreu Sá
José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Diretores-Executivos

Embrapa Hortaliças
José Amauri Buso
Chefe-Geral

Carlos Alberto Lopes
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Gilmar Paulo Henz
Chefe Ajunto de Comunicação, Negócios e Apoio

Osmar Alves Carrijo
Chefe Adjunto de Administração



ISSN 1415-2312
Setembro, 2005

*Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária
Embrapa Hortaliças
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos

**Desenvolvimento de Tecnologia de Produção
de Alho - Semente Livre de Vírus – Fase III -**

André Nepomuceno Dusi

Brasília, DF
2005

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Hortaliças
BR 060 Rodovia Brasília-Anápolis km 9
Telefone (61)385-9009
E-mail: sac.hortalicas@embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Hortaliças

Presidente: Gilmar P. Henz
Secretária-Executiva: Sulamita T. Braz
Editor Técnico: Paulo Eduardo de Melo
Membros: Nuno Rodrigo Madeira
Miriam Josefina Baptista
Alice Maria Quezado Duval

Supervisor editorial: Paula Cochrane



1ª edição
1ª impressão (2005): 50 exemplares

Todos os direitos reservados.

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

Dusi, André Nepomuceno

Desenvolvimento de tecnologia de produção de alho : semente livre de vírus : fase III / André Nepomuceno Dusí. -- Brasília : Embrapa Hortaliças, 2005.

142 p. ; 21 x 29,7 cm. - (Embrapa Hortaliças. Documentos, 76)

ISSN 1415-2312

1. Alho - Semente - Produção. 2. Semente - Livre de Vírus. I. Título. II. Série.

CDD 635.26 (21. ed.)

05/51-00

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento - MAPA
Espelho de Relatório Final de Projeto

Identificação do Projeto

Ano de Elaboração do relatório: 2005

Código: 05.2002.001

Título: Desenvolvimento de Tecnologia de Produção de Alho-Semente Livre de Vírus - Fase III

Unidade executora: Embrapa Hortaliças

Líder: André Nepomuceno Dusi

Data efetiva de início: 01/01/2002

Data de término: 31/12/2004

Subprojetos componentes:

01 - Recuperação de plantas livres de vírus de genótipos elite de alho e sua multiplicação em condições fitossanitárias controladas.

02 - Caracterização Molecular do Complexo Viral do Alho: Desenvolvimento de Sondas para Detecção dos Vírus do Complexo.

03 - Estudo da Degenerescência por Viroses na Cultura do Alho em Diversas Regiões do País.

04 - Ações de validação e difusão de tecnologias em alho-semente livre de vírus

Parceiros: Universidade de Brasília, Prefeitura Municipal de Cristópolis, Produtores em MG e GO, Diversas instituições públicas e privadas no Brasil e Argentina

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 projeto teve como objetivos finais: Validar a tecnologia de erradicação de viroses em alho, desenvolvida em projeto similar, na cultivar Amaranthe; obter plantas livres das principais viroses do alho nas cultivares Caçador, Jonas, Hossan e Quitéria;

obter estoques iniciais de alho-semente livre de vírus destas cultivares; aumentar os estoques de alho-semente livres de vírus das cultivares Caçador, Jonas, Hossan e Quitéria, mediante multiplicação em condições fitossanitárias controladas; manter estoques de alho-semente livre de vírus da cultivar Amarante; publicar trabalho científico e de resumo em congressos de sociedade científica, além de trabalhos de divulgação.

Foram obtidas plantas das cultivares Quitéria e Chonan livres de vírus, que agora estão sendo multiplicadas para início dos trabalhos de validação em campo a partir de 2006. Foram também mantidos os estoques da cv. Amarante livre de vírus. Plantas da cultivar Hozan foram submetidas ao processo de limpeza e serão indexadas posteriormente no âmbito de um novo projeto.

Foi desenvolvido um protocolo de avaliação da identidade genética da cv. Amarante baseado em RAPD. O processo continua sendo desenvolvido para as demais cultivares. Foi desenvolvido um conjunto de marcadores RAPD que possibilitou a diferenciação de diferentes cultivares de alho. A árvore filogenética gerada agrupou as diferentes cultivares de acordo com suas características fenotípicas.

Foram caracterizadas três espécies de *Allexivirus*: *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV Br), *Garlic virus C* (GarV-C) e *Garlic virus D* (GarV-D). Um isolado, supostamente de *Garlic virus B* (GarV-B) está sendo caracterizado. Foram produzidas sondas não radioativas específicas para detecção de *Allexivirus*. Este trabalho propiciou o primeiro relato da ocorrência de espécies e o estabelecimento de metodologia para detecção de *Allexivirus* no Brasil.

Os estudos de degenerescência nas diversas localidades em 2003, pois com sete exposições foi possível obter um modelo que identificou o potencial de produção em até 11 exposições. Este resultado possibilitou a elaboração de uma proposta de validação de um modelo de produção própria de alho-semente de alta qualidade, que foi testado em diferentes propriedades com a cv. Amarante.

Com os ensaios de disseminação espacial montados em 2000 e 2003, pode-se determinar que as maiores porcentagens de infecção concentram-se num raio máximo de 3 m da borda da fonte de inóculo. Não foi observado efeito de direção na disseminação.

Nos ensaios de degenerescência, além de características como produção e número de bulbos por parcela, foi avaliada também a porcentagem de infecção por vírus, utilizando-se um anti-soro polivalente, um anti-soro policlonal contra OYDV e um anti-soro produzido contra proteína da capa protéica de LYSV expressa em *E. coli*.

Pode-se concluir que a infecção por OYDV, em geral, se estabelece antes de LYSV. No ensaio de degenerescência também foi observada uma maior incidência do OYDV sobre o LYSV.

As unidades de observação, validação e demonstração possibilitaram a avaliação de um sistema de produção de alho semente livre de vírus para pequenos produtores de forma a torna-los auto-suficientes e melhorar a qualidade do alho-semente atualmente em uso. O sistema, testado por três anos consecutivos no âmbito deste projeto, em municípios dos estados de Minas Gerais e Bahia, propiciou um incremento mínimo de 50% de produtividade. Além da introdução da semente livre de vírus nas áreas avaliadas, todo o sistema produtivo foi modificado, o que propiciou uma melhoria quantitativa e qualitativa de seu produto final.

Resultados Finais

Subprojeto 1:

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: Validar a tecnologia de erradicação de viroses em alho, desenvolvida em projeto similar, na cultivar Amarante; obter plantas livres das principais viroses do alho nas cultivares Caçador, Jonas, Hossan e Quitéria; obter estoques iniciais de alho-semente livre de vírus destas cultivares; aumentar os estoques de alho-semente livres de vírus das cultivares Caçador, Jonas, Hossan e Quitéria, mediante multiplicação em condições fitossanitárias controladas; manter estoques de alho-semente livre de vírus da cultivar Amarante; publicar trabalho científico e de resumo em congressos de sociedade científica, além de trabalhos de divulgação. Foram plantados no telado 30 bulbos de Chonan, 250 de Quitéria e 20 de Branco Mossoró, que foram indexados por dot-Elisa. Os materiais foram indexados e materiais infectados eliminados. Em 2003, 307 plantas de Quitéria, 4 de Chonan e 1 de Branco Mossoró que estavam livres de vírus, resultante da multiplicação do ano anterior foram plantadas e novamente indexadas. Destas, 183 de Quitéria (60%) e 3 de Chonan (75%) estavam livres de vírus. Foi inserida uma atividade de desenvolvimento

de marcadores moleculares de RAPD para caracterização de cultivares de alho. Foi obtido um conjunto de primers capaz de distinguir a cultivar Amarante das demais cultivares. Outros conjuntos de primers estão sendo desenvolvidos. Em 2004, os conjuntos de primers foram utilizados para análise de diversidade genérica de cultivares de alho e montagem de uma árvore filogenética de cultivares de alho, evidenciando quatro grupamentos principais, que correspondem ao fenótipo observado em condições reais de cultivo. Foi constatado que o processo de limpeza clonal não provocou variação nos materiais de Amarante. Com relação às atividades de limpeza clonal, foram obtidos 226 bulbos indexados livres de vírus da cv. Quitéria e 18 da Chonan. O material de Amarante foi mantido com 65 kg produzidos. Também foram produzidos in vitro via cultura de ápices caulinares e termoterapia 64 microbulbilhos de Hozan e 20 microbulbilhos de Caçador que serão indexados.

Subprojeto 2:

Bulbos de alho das cultivares Amaranthe e Caçador foram coletados nos municípios de Água Fria (Goiás), Gama (Distrito Federal) e São Gonçalo (Minas Gerais) e analisados via Dot-Elisa com a finalidade de detectar a presença de espécies de *Allexivirus*. Testes sorológicos foram realizados utilizando anticorpos monoclonais específicos para três espécies do gênero: *Garlic virus* A (GarV-A), *Garlic virus* B (GarV-B) e *Garlic virus* C (GarV-C) e um anti-soro polivalente capaz de detectar as três espécies citadas e mais *Garlic virus* D (GarV-D). Foram observadas reações positivas de algumas amostras para cada um dos anti-soros utilizados. A purificação biológica das espécies de *Allexivirus* foi efetuada após quatro inoculações mecânicas e sucessivas em *Chenopodium quinoa*. Oligonucleotídeos específicos para amplificação da capa protéica de cada espécie foram sintetizados com base na seqüência de isolados japoneses obtidas do GenBank. Fragmentos amplificados por RT-PCR foram clonados em pGEM-T e seqüenciados automaticamente. A comparação das seqüências do gene da capa protéica completa de cada isolado brasileiro com as seqüências dos isolados japoneses e um isolado argentino revelaram a presença de *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV Br), GarV-C Br e GarV-D Br (Melo Filho *et al.* 2001a; Melo Filho *et al.* 2001b; Melo Filho *et al.* 2001c). Os resultados sorológicos revelaram também a presença de GarV-B Br. Foram produzidas sondas não radioativas específicas para detecção de *Allexivirus*. Este trabalho propiciou o primeiro relato da ocorrência de espécies e o estabelecimento de metodologia para detecção de *Allexivirus* no Brasil. Foi produzida *in vitro* a proteína capsidial de GarV-C expressa em um sistema baseado em baculovirus. A proteína purificada foi injetada em coelho para produção de um anti-soro policlonal, que resultou ser específico porém com baixo título. Em 2004, foi desenvolvido um protocolo de construção de vetor de expressão em Baculovirus com maior nível de expressão para proteínas de vírus de alho, que poderá ser empregada para qualquer gene viral.

Subprojeto 3:

No ano de 2002, foi implantado um ensaio no município de Buritis, MG, para avaliação da degenerescência causada por vírus. Foi o terceiro ano do ensaio, que vinha sendo conduzido desde 2000, dentro do projeto 05.1999.025, encerrado em 2001. Este ensaio foi repetido em 2003, acrescentando-se assim mais um ano de exposição em campo. Foi conduzido também, no campo experimental da Embrapa Hortaliças, a sétima exposição de um ensaio iniciado em 1996, conduzido pelo

estudante do curso de doutorado em fitopatologia da Universidade de Brasília, como parte de seu trabalho de tese, defendida em abril de 2003. Esse ensaio encerrou-se em 2002, pois com sete exposições foi possível obter um modelo que identificou o potencial de produção em até 11 exposições.

Foi montado o segundo ano do ensaio para avaliação do efeito de distância da fonte de inóculo e direção na disseminação de vírus em alho. O resultado de 2002 foi semelhante ao de 2001, quando se observou que as maiores porcentagens de infecção concentram-se num raio máximo de 3 m da borda da fonte de inóculo. Não foi observado efeito de direção na disseminação.

Nos ensaios de degenerescência, além de características como produção e número de bulbos por parcela, foi avaliada também a porcentagem de infecção por vírus, utilizando-se um anti-soro polivalente, um anti-soro policlonal contra OYDV e um anti-soro produzido contra proteína da capa protéica de LYSV expressa em *E. coli*. Pode-se concluir que a infecção por OYDV, em geral, se estabelece antes de LYSV. No ensaio de degenerescência também foi observada uma maior incidência do OYDV sobre o LYSV. Os resultados preliminares do ensaio na Embrapa Hortaliças indicam a possibilidade de uso de uma mesma semente por no mínimo 7 anos. Em Buritis, os resultados indicam que, quando em condições de campo que não uma estação experimental, a possibilidade de uso da mesma semente pode ser estendida por mais de 15 anos. Em razão da repetição do padrão nos ensaios conduzidos na Embrapa Hortaliças e em Buritis, decidiu-se pelo encerramento e análise final do ensaio.

Subprojeto 4:

As unidades de observação, validação e demonstração visam obter tecnologias acabadas a partir de resultados promissores obtidos em trabalhos experimentais nos centros de pesquisa. Este subprojeto tem como objetivo avaliar um sistema de produção de alho semente livre de vírus para pequenos produtores de forma a torná-los auto-suficientes e melhorar a qualidade do alho-semente atualmente em uso. Duas unidades de observação do alho livre de vírus foram implementadas junto a produtores orgânicos no Distrito Federal em abril de 2002 e pequenos produtores de alho da região de Cristópolis – BA em junho de 2002. Foram realizadas seis unidades de observação/demonstração de alho Amaranite livre de vírus, duas com produtores orgânicos do Distrito Federal e quatro com pequenos produtores de Cristópolis – BA. Na UO implantadas no DF o Amaranite livre de vírus foi comparada com as cultivares Amaranite infectada e Hozan e em Cristópolis, com cultivares utilizadas por produtores

locais (Cateto Roxo e Amarante). Em uma propriedade de Cristópolis e uma de Mirangaba-BA (região de Jacobina) foi instalado um telado de 20 m² e um campo de multiplicação de 100 m² com alho-semente livre de vírus com intuito iniciar a validação do sistema próprio de produção de alho semente. Entretanto, não foi possível obter dados desta unidade em função da incidência de ventos fortes que inutilizou o telado e por isso a unidade foi abandonada pelo produtor. Na região de Jacobina (BA) foram obtidas produções de 20 kg de bulbos curados (1,12 kg/m²) no telado e 256 kg de bulbos curados (0,90 kg/m²) fora do telado. A produtividade da cultivar Amarante livre de vírus variou de 7,0 a 11,7 t/ha em Cristópolis cuja produtividade média municipal neste mesmo ano foi 4,5 t/ha. A taxa de multiplicação do Amarante livre vírus nesta região variou de 9 – 20 para 1. No DF foram obtidas produtividades médias para Amarante LV, Amarante e Hozan de 18,5, 12,4 e 12,8 t/ha respectivamente, em sistema orgânico com cobertura morta de solo e 9,0; 7,0 e 7,0 t/ha sem cobertura morta. As taxas de multiplicação variaram de 11,4 a 23,1 para Amarante LV, 9,7 a 15,0 para Amarante e 11,5 a 12,6 para Hozan. Em 2003 foram realizadas as seguintes atividades em Cristópolis: foram instaladas cinco unidades de validação de produção própria de alho semente livre de vírus; duas unidades de observação da cultivar Hozan; um experimento e uma unidade de observação para introdução do cultivo de alho nobre; treinamento de 3 h em controle de pragas e manejo de semente em alho e colaboração na estruturação de um sistema de produção de alho para a região, em atividade conjunta com a EBDA/Barreiras. O experimento de alho nobre foi implantado com as cultivares Chonan, Caçador, Quitéria, Jonas, DDR-6024, DDR-6804, DDR-6807, RE-6811, RE-518-1 e RAL-41 em delineamento de blocos casualizados com 4 repetições. As cultivares Caçador e Jonas, devido a alta incidência de queima de folhas causada por *Stemphylium sp.*, foram colhidas em 04/08/2003 e tiveram seu rendimento bastante comprometido pela doença. Os clones mais produtivos foram o RE-6811 e RE-518-1. Na unidade de observação com a cultivar Caçador instalada pela EBDA foram coletadas quatro amostras, de 1 m² cada. A avaliação desta unidade apresentou estande final, peso de bulbo e rendimentos médios de 73,25 plantas, 15 g e 10.987,5 kg/ha, respectivamente. No experimento e na unidade foi utilizada a irrigação por microaspersão com intuito de avaliar a eficiência deste sistema na região. Foi realizado um dia de campo com a presença de 34 pessoas no dia 3 de junho e de um ciclo de palestras com 3 horas de duração no dia 4 de junho com a presença de 36 pessoas, sobre manejo de pragas e qualidade de alho semente. As produtividades das duas unidades de observação com a cultivar Hozan foram, respectivamente, 1093,4 kg/ha e

2232,0 kg/ha. As produtividades ficaram muito abaixo do esperado devido a falta de experiência dos produtores com esta cultivar. As unidades de validação de alho semente livre de vírus foram avaliadas através de amostragens nos campos de alho oriundo de semente livre de vírus e nos campos de produção de alho comum dos produtores. A alta incidência de doenças em algumas unidades comprometeu bastante o desenvolvimento e produção das plantas em algumas unidades, mas a produção de sementes foi garantida para continuidade do trabalho. A área plantada com alho semente livre de vírus em Cristópolis no ano de 2003 foi estimada em cerca de 0,5 ha. Com a semente colhida nesta área espera-se o plantio de 5 a 6 ha em 2004, 50 a 60 ha em 2005 e cerca de 600 ha em 2006. A unidade de observação com Amarante livre de vírus implantada em Novo Horizonte foi plantada em 28 de março e colhida em 8 de agosto. A parcela de primeira exposição do Amarante livre de vírus, com 47 m², produziu 250 kg de alho verde, o que dá uma produtividade de 53 t/ha. Considerando uma quebra de 30% após a cura, devido à perda d'água, a produtividade estimada é de 37 t/ha. Para o alho no segundo ano de exposição em campo, em uma área de 120 m², foram colhidos 550 kg, o que dá uma produtividade de 46 t/ha de alho fresco, equivalente a 33 t/ha de alho curado. Para complementar as informações dessas unidades de observação, falta apenas realizar a análise do percentual de reinfecção viral. Nos ensaios com as cultivares de alho comum, o Amarante livre de vírus destacou amplamente dos demais materiais em termos de produção, seguida da cultivar Gravatá que também apresentou desempenho satisfatório. Algumas unidades de demonstração do sistema de controle de irrigação foram montadas em diferentes propriedades. Os agricultores ficaram satisfeitos com a praticidade do equipamento. Foram enviados folderes explicativos do produto ao escritório local da EBDA para distribuir aos produtores. O folder contém informações básicas de uso e indica os diferentes fabricantes do produto, caso eles tenham interesse em sua aquisição. Em Capelinha foram plantados aproximadamente 18.000 bulbilhos e 120.000 bulbilhos livres de vírus da cultivar Amarante, respectivamente, em áreas de 36 m² de telado e 200 m² no campo a céu aberto. Foi montado um campo de observação/demonstração para introdução na região da cultivar Hozan. O plantio foi realizado em 10/04/2003 e a colheita em 17/09/2003. Foram colhidos aproximadamente 80 kg de bulbos curados nos telados (2,2 kg/m²) e 400 kg de bulbos curados nas áreas de campo, obtendo-se produtividade de 15,0 t/ha. Na unidade de observação/demonstração da cultivar Hozan obteve-se uma produtividade aproximada de 10,5 t/ha. Em Gouveia, as unidades foram instaladas nas comunidades Cuiabá e Alpes, principais produtoras de alho do

município. Os plantios foram realizados em 14/05/2003 e a colheita em 25/09/2003. Na comunidade Cuiabá foram instaladas unidades de 10 m² de Amarante livre de vírus e Hozan e na comunidade Alpes 8,3 m² de Hozan e 9,7 m² de Amarante livre de vírus. Nestas unidades foram comparados também o sistema de manejo tradicional do produtor local (adubação orgânica localizada e plantio a lanço sem espaçamento definido) com o sistema proposto pela EMATER – MG (adubação orgânica + química incorporada em área total do canteiro e espaçamento 20 x 10 cm). Os dados das avaliações destas unidades ainda não foram enviados à Embrapa Hortaliças pelos técnicos da EMATER – MG.

Em 2004 iniciou-se em Cristópolis a última etapa do processo de produção de alho-semente livre de vírus. Os produtores que estão conduzindo as unidades terão em 2005 alho-semente suficiente para plantio de 1 ha de alho que será destinado para comercialização. Os resultados das avaliações das quatro unidades estão apresentados nas tabelas 5 a 8 do anexo. Em 2004 foram plantados cerca de 3 ha com alho semente livre de vírus em Cristópolis e em 2005 são esperados de 15 a 20 ha.

Em Boninal/Novo Horizonte foram implantadas duas unidades de multiplicação de alho-semente livre de vírus. Estas unidades foram constituídas por um telado antiafídeos de 18 m² e 100 m² no campo. Foram obtidos 56 kg de alho semente no telado em Boninal e 35 kg no telado em Novo Horizonte. No primeiro ano fora do telado obteve-se 12 kg e 325 kg de sementes, respectivamente, em Boninal e Novo Horizonte. Em Novo Horizonte foi plantada uma área de 3.560 m² a partir de alho-semente de um campo demonstrativo implantado em 2003. Nesta área foi obtida uma produção de 7.500 kg de alho-semente de alta qualidade. O produtor já repassou cerca de 5.000 kg deste alho semente para outros produtores da região. Espera-se plantar 10 a 15 ha com esta semente em 2005, parte para uso comercial.

Em Capelinha em 2004, somando as áreas de telado e campo foi possível o plantio de aproximadamente 180 kg de alho-semente de alta qualidade numa área de aproximadamente 0,5 ha. Com esta área estima-se um plantio de aproximadamente 5 ha em 2005. Foram colhidos nesta unidade aproximadamente 3.500 kg de alho-semente de Amarante proveniente de material livre de vírus. Em 2005, parte deste material será comercializado como alho-semente e o restante será mantido pelo produtor que deverá manter uma área contínua de cerca de 2 a 3 ha por ano de produção de alho-semente livre de vírus.

Em 2004 foi plantada, em Gouveia, uma unidade de multiplicação de alho-semente em um terreno cedido pela prefeitura municipal com um telado (2.000 bulbilhos) e área de campo com 9.000 bulbilhos livres de vírus. Foram plantados 261 m² de alho Amarante livre de vírus de primeira e segunda multiplicação em campo. Na mesma área da prefeitura foram multiplicados também 10 kg de

semente da cultivar Hozan em uma área de 56,7 m², como unidade de observação/demonstração. Os resultados destas unidades ainda não foram enviados pela Emater-MG.

Em Itumirim foram montadas unidades demonstrativas com as cultivares Chonan, Caçador e Gravatá oriundas da coleção de germoplasma de alho da UFLA e Amarante LV (2^a exposição) e Hozan da Embrapa Hortaliças. O plantio foi realizado entre 05/05 e 08/05 na Fazenda da Estância dos Srs Arlindo de Lima e Sebastião Darlei de Lima. A unidade foi implantada em uma área de aproximadamente 2.000 m², seguindo recomendações técnicas da Embrapa Hortaliças e Depto. Agricultura da UFLA, com acompanhamento técnico da Emater MG. As produtividades foram 6,5 t/ha, 11,8 t/ha, 7,8 t/ha e 8,7 t/ha para Gravatá, Amarante LV, Caçador e Chonan, respectivamente.

Foram implementadas unidades de validação e observação das cultivares Amarante livre de vírus e Hozan em diversos municípios de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraná, com o intuito de divulgar a tecnologia, inclusive em sistema orgânico de produção.

Publicações

ALHO-semente com alta qualidade sanitária e fisiológica=Ajo-semilla con alta calidad sanitaria y fisiológica. Brasília: Embrapa Hortaliças; Córdoba: INTA-IFFIVE, 2004.

Folder.

A TARDE, Salvador, BA. Ano 91, n.31.092, p. 4-5, 24/05/2004. Reportagem no suplemento rural sobre as ações da Embrapa Hortaliças com alho livre de vírus e alho nobre na região de Cristópolis, BA.

BUSO, G. S. C.; DUSI, A. N.; PAIVA, M. R.; LOPES, F. F. R.; CERQUEIRA, A. A.; AMORIM, J. C.; AMARAL, Z. P. S.; BUSO, J. A. Identificação de marcadores RAPD no controle de qualidade de produção de alho-semente da cultivar Amarante e análise de diversidade de cultivares de alho. In: SIMPOSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE, 4., 2003, Mar del Plata. **Libro de resúmenes...** Mar del Plata: Universidad de Buenos Aires: INTA, 2003. p. 141.

BUSO, G. S. C.; PAIVA, M. R.; CERQUEIRA, A. A.; AMORIM, J. C. de; AMARAL, Z. P. de S.; DUSI, A. N.; TORRES, A. C.; BUSO, J. A. **Controle de qualidade de produção de alho-semente da cultivar Amarante por meio de**

marcadores RAPD. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 15 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 61).

DUSI, A. N.; ORÍLIO, A. F.; TORRES, A. C.; BUSO, J. A. Inoculum source distance and the spread of viruses in garlic. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 301, ago. 2003. Suplemento. Resumo. Trabalho apresentado no 36º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2003, Brasília.

FAJARDO, T. V. M.; TORRES, A. C.; BUSO, J. A.; ÁVILA, A. C.; RESENDE, R. O. Produção e qualidade de bulbos de alho livre de suas principais viroses. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 2, p. 207-210, abr./jun. 2002.

MELO FILHO, P. de A. **Deteção e caracterização molecular de Allexivirus e estudo da degenerescência em plantas de alho provocadas por vírus**. 2003. 134 f. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília.

MELO FILHO, P. de A.; DUSI, A. N.; BUSO, J. A.; TORRES, A. C.; RESENDE, R. O. Degenerescence of seed garlic after seven field exposures to natural virus infection. **Virus Reviews & Research**, Florianópolis, v. 8, p. 184, set. 2003. Suplemento 1. Resumo. Trabalho apresentado no 14. National Meeting of Virology, 2003, Florianópolis.

MELO FILHO, P. de A.; DUSI, A. N.; BUSO, J. A.; TORRES, A. C.; RESENDE, R. O. Diversity of Allexivirus naturally infecting garlic fields in Brazil. **Virus Reviews & Research**, Florianópolis, v. 8, p. 191, set. 2003. Suplemento 1. Resumo. Trabalho apresentado no 14. National Meeting of Virology, 2003, Florianópolis.

MELO FILHO, P. de A.; DUSI, A. N.; TORRES, C. A.; RESENDE, R. O. Gradiente de reinfecção em plantas de alho pelo complexo viral comumente associado à cultura após seis exposições em campo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Resumos e palestras...** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. p. 58.

MELO FILHO, P. de A.; DUSI, A. N.; ÁVILA, A. C.; BUSO, J. A.; TORRES, A. C.; RESENDE, R. de O. Degenerescence of garlic plants by virus infection after six

sequential field exposures. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. S209, ago. 2002. Suplemento. Resumo. Apresentado no 35º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2002.

MELO FILHO, P. de A.; DUSI, A. N.; BUSO, J. A.; TORRES, A. C.; ÁVILA, A. C.; RESENDE, R. de O. Degenerescence of garlic plants caused by virus infection after five sequential field generations. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 1, p. 107-108, jan./mar. 2002. Resumo. Trabalho apresentado no CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA.

MELO FILHO, P. de A.; DUSI, A. N.; COSTA, C. L.; RESENDE, R. de O. Colonização de plantas de alho por *Neotoxoptera formosana* (Hemiptera: Aphidoidea) no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, jul. 2003. Suplemento 2. Trabalho apresentado no 43º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2003. Publicado também como resumo em: Horticultura Brasileira, Brasília, v. 21, n. 2, p. 413, jul. 2003. Suplemento 1.

MELO FILHO, P. de A.; DUSI, A. N.; RESENDE, R. O. Serological detection and characterization of Garlic virus B (GarV-B) (Allexivirus) associated to garlic plants in Minas Gerais and Goiás. **Virus Reviews & Research**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 157, set. 2002. Resumo. Suplemento.

MELO FILHO, P. de A.; DUSI, A. N.; RESENDE, R. O. Detecção sorológica de Garlic virus A (GarV-A) em plantas de alho apresentando sintomas de infecção por vírus. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 1, p. 100, jan./mar. 2002. Resumo.

MELO FILHO, P. de A.; NAGATA, T.; DUSI, A. N.; BUSO, J. A.; TORRES, A. C.; EIRAS, M.; RESENDE, R. de O. Detection of three Allexivirus species infecting garlic in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 735-740, ago. 2004.

ORÍLIO, A. F.; RESENDE, F. V.; TORRES, A. C.; BUSO, J. A.; DUSI, A. N. Virus infection rates in garlic under field condition at a seed production system under validation. **Virus Reviews & Research**, Florianópolis, v. 9, p. 251-252, 2004. Suplemento 1. Resumo. Trabalho apresentado no 15º National Meeting of Virology, São Pedro, 2004.

ORÍLIO, A. F.; TORRES, A. C.; DUSI, A. N. Obtention of virus-free superior varieties garlic-seed. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. S101, ago. 2004. Resumo. Trabalho apresentado no 37º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Gramado.

PAIVA, M. R.; CERQUEIRA, A. A.; AMORIM, J. C.; DUSI, A. N.; TORRES, A. C.; RESENDE, F. V.; BUSO, J. A.; G. S. C. Estudo da variabilidade genética de acessos de banco de germoplasma de alho utilizando marcadores RAPD. CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 50., 2004, Florianópolis. **50 anos desvendando a genética**: resumos. Florianópolis: SGB, 2004. CD-ROM.

PAIVA, M. R.; LOPES, F. F. R.; CERQUEIRA, A. A.; AMORIM, J. C.; AMARAL, Z. P. S.; DUSI, A. N.; BUSO, J. A.; BUSO, G. S. C. Identificação de marcadores RAPD para utilização no controle de qualidade de produção de alho-semente da cultivar Amaranthe. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Ribeirão Preto. **A dupla hélice do DNA**: [Resumos]. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2003. Resumo.

RESENDE, F.V. Alho: grande mercado. **Cultivar Hortaliças e frutas**. V.28, outubro de 2004. 6p. (encarte especial).

RESENDE, F. V.; DUSI, A. N.; MELO, W. F. de. **Recomendações básicas para a produção de alho em pequenas propriedades**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2004. 12 p. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 22).

RESENDE, F. V.; TORRES, A. C.; BUSO, J. A.; ORÍLIO, A. F.; DUSI, A. N. Avaliação de um sistema de produção própria de alho-semente de alta qualidade sanitária e fisiológica por pequenos produtores da Bahia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, jul. 2004. Suplemento 2. Trabalho apresentado no 44º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2004. Publicado também como resumo em: Horticultura Brasileira, Brasília, v. 22, n. 2, p. 474, jul. 2004. Suplemento.

Patentes

Não há

Tecnologia, Serviços e Produtos

A Embrapa hortaliças vem mantendo estoques de bulbilhos de alho cvs. Amarante, Quitéria e Chonan livre de vírus para serem utilizados na implantação de sistemas de produção de alho semente livre de vírus, sete unidades novas anualmente.

Transferência de Tecnologia e de Conhecimentos

Artigos em revistas científicas, resumos e apresentação de trabalhos em congressos, visita a produtores. Foram também ministrados os seguintes cursos:

Curso Cultura de Tecidos de Plantas

Local: Embrapa Hortaliças

Período: 10 a 12 de abril de 2002

Carga horária: 20 horas

Alunos: 12 estudantes de biologia da Universidade Federal de Roraima

Curso: Prática de Cultura de Tecidos de Plantas

Período: 15 a 17 de novembro de 2002

Carga Horária: 20 horas

Local: Embrapa Hortaliças

Curso: Cultura de Células e Tecidos de Plantas

Período: 2º Período letivo de 2002

Carga Horária: 30 horas

Local: UnB

Consultoria ao Governo da República da China

Período: 11 a 30 de outubro de 2002

Local: China

Consultoria ao Governo de Angola

Período: 11 a 23 de junho de 2002

Local: Angola

Dia de Campo na TV: Produção de alho semente de alta qualidade. 01/10/2004, 9:00 – 10:00 hs. Explica a obtenção do alho semente livre de vírus e como este material de alta qualidade fitossanitária e fisiológica deve ser produzido na propriedade do agricultor, que em quatro anos poderá substituir toda sua semente tradicional. O Dia de Campo na TV foi transmitido ao vivo do estúdio da Embrapa Informação Tecnológica, em Brasília, para todo o país, via satélite.

Dia de campo: Cultura do Alho. 27/08/2004. 12:00 – 15:00 hs Fazenda Estância, Itumirim – MG. Realizado com pela Embrapa Hortaliças com a colaboração da Emater – MG e Universidade Federal de Lavras. Teve como objetivo apresentar informações sobre cultivares, produção de alho-semente, sistema de produção e colheita e beneficiamento do alho para pequenos produtores de leite e milho desta região interessados em diversificar suas atividades.

Dia de campo: Cultivo de mandioquinha salsa e produção de alho-semente. 25/08/2004. 8:00 – 12:00 hs. Sede da prefeitura municipal, Gouveia – MG. . Realizado com pela Embrapa Hortaliças com a colaboração da Emater – MG. Teve como objetivo demonstrar aspectos de produção da mandioquinha-salsa e apresentar os resultados da unidade de validação de produção de alho-semente livre de vírus para os produtores de alho daquela região.

Planejado/Realizado

Metas cumpridas conforme programadas.

Equipe Técnica

André Nepomuceno Dusi, Líder

Antônio Carlos Torres, Responsável por subprojeto

Francisco Vilela Resende, Responsável por subprojeto

Renato de Oliveira Resende, Responsável por subprojeto

José Amauri Buso, colaborador

Werito Fernandes de Melo, colaborador

Avaliação Global do Andamento

As atividades do subprojeto 1 foram desenvolvidas de acordo com o cronograma planejado. Tivemos problema com a aposentadoria de um técnico. A contratação de novo técnico supriu a deficiência de mão de obra.

O subprojeto 2 não alcançou a meta de produção de sondas, que foi parcialmente atingida. As demais metas foram alcançadas.

Os subprojeto 3 e 4 tiveram condução normal.

Situação Geral do Projeto

Avaliação do líder: Concluído

Nota para a relação programado/realizado:10

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento - MAPA
Espelho de Relatório Final de Subprojeto

Identificação do Subprojeto

Ano de Elaboração do relatório: 2005

Código: 05.2002.001-01

Título: : Recuperação de plantas livres de vírus de genótipos elite de alho e sua multiplicação em condições fitossanitárias controladas

Unidade executora: Embrapa Hortaliças

Responsável: Antonio Carlos Torres

Data efetiva de início: 01/01/2002

Data de término: 31/12/2004

Parceiros

Projeto ao qual está vinculado

Título: Desenvolvimento de Tecnologia de Produção de Alho-Semente Livre de Vírus -
Fase III

Líder: Andre N. Dusi

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: Validar a tecnologia de erradicação de viroses em alho, desenvolvida em projeto similar, na cultivar Amarante; obter plantas livres das principais viroses do alho nas cultivares Caçador, Jonas, Hossan e Quitéria; obter estoques iniciais de alho-semente livre de vírus destas cultivares; aumentar os estoques de alho-semente livres de vírus das cultivares Caçador, Jonas, Hossan e Quitéria, mediante multiplicação em condições fitossanitárias controladas; manter estoques de alho-semente livre de vírus da cultivar Amarante; publicar trabalho científico e de resumo em congressos de sociedade científica, além de trabalhos de divulgação. Foram plantados no telado 30 bulbos de Chonan, 250 de Quitéria e 20 de Branco Mossoró, que foram indexados por dot-Elisa. Os materiais foram indexados e

materiais infectados eliminados. Em 2003, 307 plantas de Quitéria, 4 de Chonan e 1 de Branco Mossoró que estavam livres de vírus, resultante da multiplicação do ano anterior foram plantadas e novamente indexadas. Destas, 183 de Quitéria (60%) e 3 de Chonan (75%) estavam livres de vírus. Foi inserida uma atividade de desenvolvimento de marcadores moleculares de RAPD para caracterização de cultivares de alho. Foi obtido um conjunto de primers capaz de distinguir a cultivar Amarante das demais cultivares. Outros conjuntos de primers estão sendo desenvolvidos. Em 2004, os conjuntos de primers foram utilizados para análise de diversidade genérica de cultivares de alho e montagem de uma árvore filogenética de cultivares de alho, evidenciando quatro grupamentos principais, que correspondem ao fenótipo observado em condições reais de cultivo. Foi constatado que o processo de limpeza clonal não provocou variação nos materiais de Amarante. Com relação às atividades de limpeza clonal, foram obtidos 226 bulbos indexados livres de vírus da cv. Quitéria e 18 da Chonan. O material de Amarante foi mantido com 65 kg produzidos. Também foram produzidos in vitro via cultura de ápices caulinares e termoterapia 64 microbulbilhos de Hozan e 20 microbulbilhos de Caçador que serão indexados.

Resultados Finais

Bulbilhos de alho da cv. Chonan e Hozan foram mantidos em câmara fria a 4°C por cerca de 60 dias para quebra de dormência. Posteriormente, colocados em câmara termoterápica (temperatura de 37°C). Após 35 dias foram excisados ápices caulinares, respectivamente de ambas as cultivares, e colocados no meio de cultura de referência (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. Foram colocados em termoterapia 500 bulbilhos. Foram produzidos 66 microbulbilhos (42 da cultivar Chonan e 14 da cultivar Hozan). Os microbulbilhos foram plantados em 2003 em casa de vegetação para produção de bulbilhos para serem indexados. Também em 2003, 307 bulbilhos de Quitéria, 4 de Chonan e 1 de Branco Mossoró que estavam livres de vírus, resultante da multiplicação do ano anterior foram plantadas e novamente indexadas por dot-Elisa com anti-soro contra o complexo viral, OYDV e LYSV. Destas, 183 de Quitéria (60%) e 3 de Chonan (75%) estavam livres de vírus. Em 2004 foram produzidos, em casa de vegetação, alho livre de vírus das seguintes cultivares: Amarante (65 Kg), Quitéria (228 bulbos), Chonan (18 bulbos).

De janeiro a dezembro de 2002 foram desenvolvidas as atividades

1. Manutenção em telado dos estoques de plantas livres de vírus da cultivar Amaranthe, para os trabalhos de campo. Foram produzidos 90.000 bulbilhos distribuídos para: Cristópolis, BA (50.000); Capelinha, MG (20.000); Buritis, GO (1.500); GO (5.000). Também foram mantidos *in vitro* um estoque de segurança de 100 plantas desse material.

2. Validação da tecnologia de termoterapia de bulbilhos a seco e cultura de tecidos para recuperação de plantas livres de vírus da cultivar Hossan e Chonan.

3. Foram mantidos *in vitro*:

40 microbulbos da cultivar Chonan

52 microbulbos da cultivar Quitéria

43 microbulbos da cultivar Hozan

4. Dos microbulbos produzidos em 2001 e plantados em telado no ano 2002 foram obtidos aproximadamente:

30 bulbos da cultivar Chonan

250 bulbos da cultivar Quitéria

20 bulbos da cultivar Branco de Mossoró.

Os materiais foram indexados e materiais infectados eliminados.

De janeiro a dezembro de 2003, 307 bulbilhos de Quitéria, 4 de Chonan e 1 de Branco Mossoró que estavam livres de vírus, resultante da multiplicação do ano anterior foram plantadas e novamente indexadas por dot-Elisa com anti-soro contra o complexo viral, OYDV e LYSV. Destas, 183 de Quitéria (60%) e 3 de Chonan (75%) estavam livres de vírus. Os bulbos foram colhidos para multiplicação em 2004.

Sendo o alho uma espécie de propagação vegetativa, há acúmulo, entre gerações de multiplicação, de agentes causais de doenças importantes, que são transportados de um ciclo de produção a outro, via bulbilho-semente contaminado. Praticamente todo o alho-semente utilizado no Brasil está contaminado com um ou mais patógenos, notadamente viroses. Estas doenças causam diminuição da produtividade e da qualidade dos bulbos produzidos. Objetivando um melhoramento da qualidade sanitária do alho-semente, foram obtidos estoques de material livres de vírus da cultivar Amaranthe (aproximadamente 25.000 bulbilhos). A capacidade de distinção de cultivares de alho, visando a detecção de mistura varietal após multiplicação *in vitro*

é extremamente importante. No segundo ciclo de multiplicação, em casa de vegetação, a correta identificação da cultivar não é possível até que os bulbos sejam produzidos.

Marcadores obtidos através da amplificação ao acaso de DNA polimórfico (RAPD) podem ser utilizados para diferenciar cultivares quando estas não são ou não estão em uma fase morfológicamente distinguíveis (Welsh e McClelland, 1990). Estes marcadores são rápidos de se obter e têm custo acessível, podendo ser uma alternativa para uso em controle de qualidade de lotes iniciais após a fase de termoterapia e cultura de ápices caulinares. Propõe-se, portanto, a utilização de marcadores RAPD na verificação de mistura varietal, após multiplicação *in vitro*, certificando-se assim a pureza ou correta identificação dos clones produzidos. Além disso, com os dados obtidos pode-se proceder à análise de diversidade entre as cultivares analisadas.

De janeiro a dezembro de 2004 foram comparados conjuntos de cinco plantas de algumas cultivares: Gigante de Lavínia, Hozan, Chinês São Joaquim, Joana, Peruano, Centenário, Roxo Caxiense, Branco Mineiro, Gigante Roxo, Chinês Real, Chinezão, Dourados, Mossoró, Quitéria, Chonan, Caçador, Amarante (este último infectado com vírus), com cinco conjuntos de 20 indivíduos cada de plantas da cultivar Amarante comprovadamente livres de vírus, provenientes de termoterapia e multiplicação "in vitro".

As reações de amplificação do DNA foram feitas por PCR ("Polymerase Chain Reaction"), utilizando um coquetel de reagentes contendo 3,0 µl de DNA genômico a 2,5 ng/µl; 4,92 µl de água milli-Q autoclavada; 1,30 µl de Tampão 10X para Taq DNA Polimerase; 1,04 µl de dNTP 2,5 mM; 1,04 µl de BSA 2,5 mM; 1,5 µl de Primer (operon Technologies, USA) 10ng/µl e 0,2 µl de enzima Taq DNA polimerase. Foram testados 568 primers randômicos e 92 foram selecionados com base no nível e qualidade de polimorfismo. Cada reação foi realizada em um termociclador MJ, programado para 40 ciclos de: 1 min a 92°C, 1 min a 35°C, 2 min a 75°C. Aos produtos das reações foram adicionados 3 µl de tampão de carregamento e separados por eletroforese em géis de agarose a 1,5% com marcadores 1Kb nos poços adjacentes às amostras já carregadas. A seleção de bandas se baseou na repetibilidade, clareza e resolução da mesma.

Análise de similaridade genética: O "fingerprint" de DNA obtido a partir desta técnica permitiu gerar uma matriz binária baseada na presença ou ausência de marcadores RAPD, utilizada para estimar a similaridade genética entre os acessos,

empregando-se o coeficiente de Jaccard. Os acessos foram agrupados segundo sua similaridade pelo método de agrupamento UPGMA ("Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average") utilizando o software NTSYS versão 2.02pc (Rohlf, 1992) e os agrupamentos observados através de dendrograma, que mostra graficamente a variabilidade entre as cultivares analisadas.

Oitenta primers randômicos foram utilizados, dos quais doze apresentaram polimorfismo. Foram identificados dezesseis marcadores RAPD que só foram amplificados nas amostras da cultivar Amarante, distinguindo-a das demais cultivares (Figura 1 e 2). Recentemente, marcadores moleculares têm sido utilizados para testar a fidelidade genética durante a micropropagação devido a importância crescente desta forma de propagação para algumas plantas cultivadas. Este tem sido o caso do alho, que tem passado por termoterapia e micropropagação para produção de alho-semente livre de vírus. Como várias cultivares são manipuladas ao mesmo tempo, existe o risco de mistura varietal após todo o procedimento. Nos "bulks" da cultivar Amarante produzida por micropropagação nenhuma diferença foi constatada entre o perfil das amostras livres de vírus e infectadas. Confirmou-se, portanto, que não houve mistura varietal na manipulação do material analisado na fase de limpeza clonal. Além disso, os dezesseis marcadores RAPD mostraram-se adequados para a identificação da cultivar Amarante quando comparada às demais cultivares avaliadas, todas sendo manipuladas em laboratório de biologia celular no processo de erradicação de vírus.

Noventa e nove marcadores RAPD foram utilizados para análise de diversidade entre as cultivares. A similaridade variou entre 13 e 98% e a análise de agrupamento evidenciou 4 grupos principais.

Com relação a produção de alho livres de vírus em casa de vegetação obtiveram-se: 65 Kg de Amarante, 226 bulbos de Quitéria, 18 bulbos de Chonan.

Também foram produzidos in vitro via cultura de ápices caulinares e termoterapia 64 microbulbilhos de Hozan e 20 microbulbilhos de Caçador que serão indexados.

Publicações

FAJARDO, T.V.; **TORRES**, A.C.; BUSO, J.A.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Produção e qualidade de bulbos de alho livre das principais viroses. *Summa Phytopathologica*, v.28, n.2, p.207-210, 2002.

MELO FILHO, P.A.; DUSI, A.N.; **TORRES**, A.C.; RESENDE, R.O.; AVILA, A.C.

Gradiente de reinfecção em plantas de alho pelo complexo viral comumente associado á cultura após seis exposições em campo. In: Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes. Sete Lagoas: Resumos/Palestras. Embrapa Milho e Sorgo, p. 58, 2002.

MELO FILHO, P.A.; DUSI, A.N.; BUSO, J.A.; TORRES, A.C.; RESENDE,

R.O. Degenerence of garlic plants by virus infection after six sequential field exposure. XXXV Congresso Brasileiro de Fitopatologia 2002. Recife, Fitopatologia Brasileira, V.27, Suplemento p. 52

PAIVA, M R, LOPES, F F R, CERQUEIRA, A A, AMORIM, J C, AMARAL, Z P S, DUSI, A N, BUSO, J A, BUSO, Glauca Salles Cortopassi. Identificação de marcadores RAPD para utilização no controle de qualidade de produção de alho-semente da cultivar Amarante. In: 49 CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2003, Águas de Lindóia. Resumos do 49 Congresso Brasileiro de Genética. 2003. p.558-558.

BUSO, Glauca Salles Cortopassi, DUSI, André N, PAIVA, Martinho R, LOPES, Flávia F R, CERQUEIRA, Allen A, AMORIM, Jaqueline C, AMARAL, Zilneide P S, BUSO, José Amauri. Identificação de marcadores RAPD no controle de qualidade de produção de alho-semente da cultivar Amarante e análise de diversidade de cultivares de alho. In: IV SIMPOSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE, 2003, Mar del Plata. Libro de resúmenes do IV Simposio de recursos genéticos para América Latina y el Caribe. 2003. v.01. p.141-141.

Patentes

Tecnologia, Serviços e Produtos

A Embrapa hortaliças vem mantendo estoques de bulbilhos de alho cv. Amarante livre de vírus para serem utilizados na implantação de sistemas de produção de alho semente livre de vírus, sete unidades novas anualmente.

Transferência de Tecnologia e de Conhecimentos

Curso Cultura de Tecidos de Plantas

Local: Embrapa Hortaliças

Período: 10 a 12 de abril de 2002

Carga horária: 20 horas

Alunos: 12 estudantes de biologia da Universidade Federal de Roraima

Curso: Prática de Cultura de Tecidos de Plantas

Período: 15 a 17 de novembro de 2002

Carga Horária: 20 horas

Local: Embrapa Hortaliças

Curso: Cultura de Células e Tecidos de Plantas

Período: 2º Período letivo de 2002

Carga Horária: 30 horas

Local: UnB

Consultoria ao Governo da Republica da China

Período: 11 a 30 de outubro de 2002

Local: China

Consultoria ao Governo de Angola

Período: 11 a 23 de junho de 2002

Local: Angola

Planejado/Realizado

1. Recuperação de pelo menos vinte plantas livres de vírus das cultivares Chonan e Hozan ate dezembro de 2003.
2. Recuperação de pelo menos 50 plantas livres de vírus das cultivares Caçador,

Chonan, Hozan e Quitéria até dezembro de 2004.

3. Aumento dos estoques iniciais para 50 Kg de plantas livre de vírus da cultivar Amaranthe até dezembro de 2004.
4. Aumento dos estoques iniciais para no mínimo 50 plantas livre de vírus das cultivares Chonan e, Hozan até dezembro de 2004

Todas as metas propostas estão sendo realizadas dentro do previsto.

Equipe Técnica

Equipe Técnica

Antonio C. Torres	PhD, Biologia Celular	Embrapa Hortaliças	Responsável	40%
Andre N. Dusi	Doutor, Virologia	Embrapa Hortaliças	Membro	5%
33 Gláucia Salles	Doutor, Biologia	Embrapa Recursos	Membro	10%
Cortopassi Buso	Molecular	Genéticos e Biotecnologia	€ <i>colaborador</i>	
Francisco Resende	Vilela Doutor, Fitotecnia	Embrapa Hortaliças	Membro	5%

Avaliação Global do Andamento

Concluído

Situação Geral do Subprojeto

Avaliação do responsável: Concluído

Avaliação do líder (quantitativa): 10

Anexos

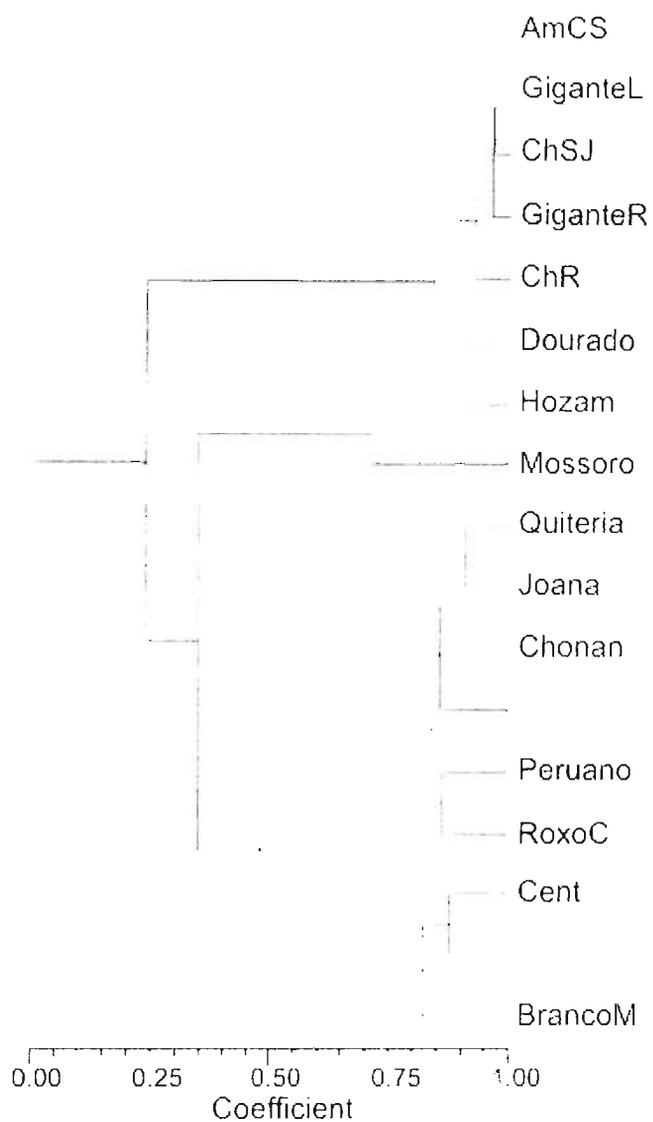


Figura 1. Análise da aglomeração hierárquica pelo método UPGMA de 17 cultivares de alho baseada na estimativa de similaridade genética computada pela análise de 99 fragmentos de DNA amplificados ao acaso (RAPD).

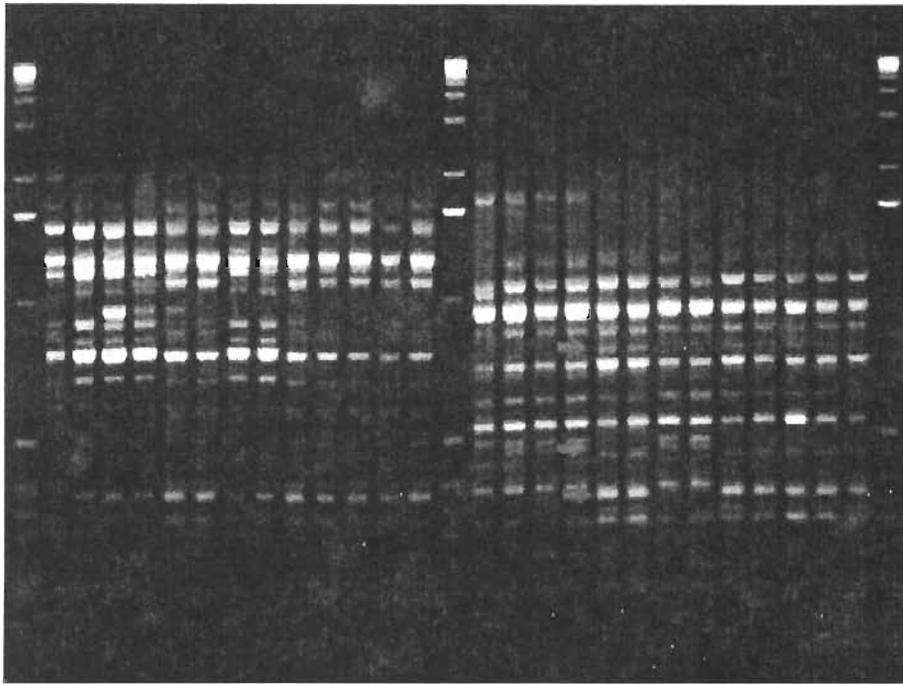


Figura 2. Fingerprint molecular de cultivares de alho detectado através da técnica de RAPD. Da esquerda para a direita: marcador 1 Kb, Mossoró, Quitéria, Chonan, Caçador, Amarante, Amarante livre de vírus, Caçador livre de vírus e Chonan livre de vírus, grupamentos 1, 2, 3, 4 e 5 de plantas de Amarante provenientes de termoterapia e cultura in vitro. As setas indicam marcadores da cultivar Amarante.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento - MAPA
Espelho de Relatório Final de Subprojeto



Identificação do Subprojeto

Ano de Elaboração do relatório: 2005

Código: 05.2002.001-02

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

Unidade executora: Universidade de Brasília

Responsável: Renato de Oliveira Resende

Data efetiva de início: 01/01/2002

Data de término: 31/12/2004

Parceiros: Embrapa Hortaliças

Projeto ao qual está vinculado

Título: Desenvolvimento de Tecnologia de Produção de Alho-Semente Livre de Vírus - Fase III

Líder: André Nepomuceno Dusi

Resumo

Bulbos de alho das cultivares Amarante e Caçador foram coletados nos municípios de Água Fria (Goiás), Gama (Distrito Federal) e São Gonçalo (Minas Gerais) e analisados via Dot-Elisa com a finalidade de detectar a presença de espécies de *Allexivirus*. Testes sorológicos foram realizados utilizando anticorpos monoclonais específicos para três espécies do gênero: *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B) e *Garlic virus C* (GarV-C) e um anti-soro polivalente capaz de detectar as três espécies citadas e mais *Garlic virus D* (GarV-D). Foram observadas reações positivas de algumas amostras para cada um dos anti-soros utilizados. A purificação biológica das espécies de *Allexivirus* foi efetuada após quatro inoculações mecânicas e sucessivas em *Chenopodium quinoa*. Oligonucleotídeos específicos para amplificação da capa protéica de cada espécie foram sintetizados com base na seqüência de isolados japoneses obtidas do GenBank. Fragmentos amplificados por RT-PCR foram clonados em pGEM-T e seqüenciados automaticamente. A comparação das seqüências do gene da capa protéica completa de cada isolado brasileiro com as

seqüências dos isolados japoneses e um isolado argentino revelaram a presença de *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV Br), GarV-C Br e GarV-D Br (Melo Filho *et al.* 2001a; Melo Filho *et al.* 2001b; Melo Filho *et al.* 2001c). Os resultados sorológicos revelaram também a presença de GarV-B Br. Foram produzidas sondas não radioativas específicas para detecção de *Allexivirus*. Este trabalho propiciou o primeiro relato da ocorrência de espécies e o estabelecimento de metodologia para detecção de *Allexivirus* no Brasil. Foi produzida *in vitro* a proteína capsidial de GarV-C expressa em um sistema baseado em baculovirus. A proteína purificada foi injetada em coelho para produção de um anti-soro policlonal, que resultou ser específico porém com baixo título. Em 2004, foi desenvolvido um protocolo de construção de vetor de expressão em Baculovirus com maior nível de expressão para proteínas de vírus de alho, que poderá ser empregada para qualquer gene viral.

Resultados Finais

Os testes sorológicos efetuados em amostras da cv. Amaranthe coletadas no DF e GO mostraram reações positivas para os quatro anti-soros. A amostra da cultivar Caçador, proveniente de MG, só reagiu com anti-soro específico para GarV-B.

1. Espécies de *Allexivirus* detectadas via sorologia e RT-PCR

O resultado dos testes sorológicos realizados por Dot-Elisa revelou a detecção de amostras infectadas com *Allexivirus* das espécies: GarMbFV Br (só confirmada após o seqüenciamento), GarV-B Br, GarV-C Br e GarV-D Br. A amplificação via RT-PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para cada espécie, resultou em bandas de tamanho esperado com aproximadamente 800 pb, com exceção de GarV-B Br, onde foi observada uma banda com aproximadamente 500 pb.

2. Seqüência do gene da capa protéica do isolado brasileiro de *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV Br)

Na reação de RT-PCR utilizando-se os oligonucleotídeos específicos para GarV-A, um fragmento de 800 pb foi amplificado. No entanto, o seqüenciamento mostrou que o vírus amplificado apresentou alta identidade com GarMbFV caracterizado na Argentina. O percentual de identidade na seqüência de nucleotídeos da CP do GarMbFV Br (762 pb Figura 1) e de aminoácidos (254 aa, Figura 2), quando comparado ao isolado argentino, foi de 96,6 % para ambos os casos, e quando comparado com o isolado japonês de GarV-A, foi de apenas 89 % (Tabela 1).

3. Seqüência do gene da capa protéica de *Garlic virus B* (GarV-B Br)

Para esta espécie, os oligonucleotídeos não amplificaram o fragmento esperado, apesar da reação sorológica positiva. Para essa espécie, os trabalhos deverão continuar até que se possa obter seu seqüenciamento.

4. Seqüência do gene da capa protéica de *Garlic virus C* (GarV-C Br)

Os resultados do seqüenciamento para GarV-C Br também confirmaram os resultados sorológicos. A análise da seqüência do GarV-C Br mostrou elevada identidade de nucleotídeos e aminoácidos com *Garlic mite-borne mosaic virus*, nome tentativo proposto em 1996 por Yamashita para esta espécie (Yamashita et al., 1996), hoje GarV-C. A seqüência de nucleotídeos do gene da CP do GarV-C Br apresenta 781 pb (Figura 3) e tem um percentual de identidade de nucleotídeos de 92,3 % com o isolado japonês (Yamashita, et al.,1996). Para aminoácidos (260 aa, Figura 4), o percentual de identidade foi de 95 % (Tabela 1), com apenas quatorze aminoácidos diferentes.

5. Seqüência do gene da capa protéica de *Garlic virus D* (GarV-D Br)

Do mesmo modo, foi seqüenciada a CP completa desta espécie, que apresenta uma ORF com 753 nucleotídeos (Figura 5) e 251 aminoácidos (Figura 6). A comparação da seqüência do isolado brasileiro com o isolado japonês revelou um percentual de identidade de nucleotídeos de 92,6 % e de aminoácidos de 96,8 % (Tabela 1). Para esta espécie, apenas 10 aminoácidos são diferentes do que se encontra no isolado japonês.

Atendendo à portaria ministerial nº 290/96 MARA, os resultados ora obtidos foram comunicados à Secretaria de Defesa Agropecuária – SDA, do Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal – DDIV, do Ministério da Agricultura Abastecimento e Agropecuária – MARA, em 29 de junho de 2000. Em 23 de março de 2001 a SDA/DDIV autorizou a publicação dos resultados desse trabalho.

6. Eficiência dos oligonucleotídeos em amplificar parte do gene da capa protéica de espécies de *Allexivirus* a partir de mRNA total

O par de oligonucleotídeos sintetizado para identificar as várias espécies de *Allexivirus* permitiu a obtenção de fragmentos com 457 pb (Figura 7).


```

601 TTCAAACCCACAGATGCTGAAATTCTCGCACATTCCATGAACGCCAAGAT 650
651 GTCCATTGTGGAGTCCAGACGAGCCACTAATATGGTGTCAACCCGTGCGG 700
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
651 GTCCATTGTGGAGTCCAGACGAGCCACTAATATGGTGTCAACCCGCGCGG 700

701 ACCTACTTGCACAACAACAATCCATGAACAGCCGAAACCTCCCATGATT 750
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
701 ACCTACTTGCACAACAACAATCCATGAACAGCCGAAACCTCCCATGATT 750

751 ACGTTCTGATGA 762 3
    ||||||||
751 ACGTTCTGATGA 762

```

Figura 1. Alinhamento da seqüência de nucleotídeos da capa protéica de isolados de *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV) encontrados no Brasil e Argentina (Acesso X98991). Letras em negrito representam sítio de *Hind III*.

Tabela 1. Porcentagem de identidade na seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da capa protéica de isolados brasileiros, japoneses e argentino de *Allexivirus*.

Isolados brasileiros argentino	Isolados japoneses								Isolado	
	GarV-A*		GarV-B*		GarV-C		GarV-D		GarMbFV	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
GarMbFV Br	-	89	-	64	-	65	-	75	96,6	96,6
GarV-C Br	-	63	-	70	92,3	95	-	65	-	64
GarV-D Br	-	76	-	65	-	64	92,6	96,8	-	75

* - Espécies não seqüenciadas no Brasil, 2002.

nt - nucleotídeos.

aa - aminoácidos

A banda correspondente à seqüência de parte da capa protéica de GarV-C Br (Figura 8) foi coletada e seqüenciada confirmando a identificação desta espécie. O percentual de identidade de nucleotídeos da seqüência obtida com o GarV-C brasileiro foi de 95 % e com o GarV-C japonês foi de 90 %. Esse resultado confirmou a eficiência dos oligonucleotídeos.

7. Resultados dos testes de hibridização em membranas de náilon

Os testes de hibridização Dot-Blot em membranas de náilon revelaram uma capacidade diferenciada das três sondas em detectar as diferentes espécies de *Allexivirus* clonadas em pGEM-T. A sonda número 1, que foi sintetizada tomando-se como base a seqüência do gene completo da capa protéica de GarMbFV Br, foi capaz de identificar GarMbFV Br, GarV-C Br e GarV-D Br (Figura 8). Esta sonda mostrou fraca hibridização com pBluescrip (Stratagene) e com p-GEM-T (Promega), utilizados como controle negativo. O pBluescript foi testado como controle negativo uma vez que, em continuidade à pesquisa, será estudada a possibilidade da expressão da proteína capsidial dos *Allexivirus* em sistema baculovírus para produção de anti-soro. Para o desenvolvimento deste tipo de investigação, será necessária a clonagem dos fragmentos da CP destas espécies neste vetor. Para o p-GEM-T, seu uso como controle negativo buscou comprovar a especificidade das sondas com os fragmentos em teste. Esta sonda 1 foi capaz de hibridizar com GarMbFV Br até a concentração de 1 ng/μl de fragmento. Com GarV-C Br até a concentração de 0,1 ng/μl e com GarV-D Br somente a 10 ng/μl (Figura 8).

A sonda 2, produzida com base no fragmento da CP de GarV-C Br, foi capaz de identificar apenas esta espécie e na concentração de 10 ng/μl (Figura 13), além de não hibridizar nem com pBluescript, nem com p-GEM-T (Figura 8).

A sonda 3, sintetizada com base em fragmento de GarV-D Br, também foi capaz de hibridizar com as três espécies de *Allexivirus* (Figura 8) e sem hibridizar com os dois plasmídeos testados. Esta permitiu a detecção de GarMbFV Br e GarV-D Br apenas na concentração de 10 ng/μl e GarV-C Br até a concentração de 1 ng/μl (Figura 8).

8. Eficiência das sondas a partir de extrato bruto de plantas infectadas com *Allexivirus*

desenvolvidos por Koo et al. (2002) com as espécies GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E, GarV-X e ShV-X e os aqui apresentados, permitem concluir que os isolados encontrados em várias partes do mundo confirmam um elevado grau de identidade na seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da CP desses *Allexivirus*, porém, estes são filogeneticamente mais distantes de GarMbFV e de ShV-X que entre si.

A distância filogenética entre o GarV-C Br e o GarV-C japonês foi pequena, o que representa elevado grau de relacionamento (Figura 9). O mesmo foi verificado para o GarV-D Br e japonês. Estes resultados permitem concluir serem apenas isolados diferentes de uma mesma espécie.

Os resultados encontrados em Sumi et al. (1993) mostram GarV-C mais distante filogeneticamente de GarV-A que GarV-D. Também entre os isolados brasileiros, existe uma distância filogenética maior entre GarV-C e GarV-A que para GarV-D (Figura 9). Em Koo et al. (2002), isso também foi verificado. Isso sugere ter havido algum processo de modificação genética em GarV-C. Tal variação pode ter ocorrido em função de alguma adaptação desta espécie às condições de ambiente tanto na Coréia como no Brasil.

A pequena distância filogenética envolvendo GarV-A japonês e os isolados de GarMbFV (Figura 9), sugere novamente que pode ter ocorrido algum tipo de modificação genética nesta espécie resultando no surgimento de GarMbFV. Mais uma vez, tal variação pode ter surgido como adaptação desta espécie às condições climáticas existentes na Argentina ou no Brasil. Observa-se, por exemplo, a presença de um sítio de *Hind III* interno na seqüência da capa protéica nos isolados de GarMbFV Br e argentino, fato não existente em GarV-A. Também o número de nucleotídeos presentes na seqüência da capa protéica de GarMbFV Br e argentino (762 nt), é maior que em GarV-A (755 nt). Condição semelhante de coevolução também foram identificadas para outros gêneros de vírus. Recentemente, Derengowski et al. (2002) demonstraram que isolados de *Maize rayado fino virus* originários da Argentina e Brasil, apresentaram 100 % de identidade de aminoácidos da CP, no entanto, diferiram em aproximadamente 8 a 9 % de isolados provenientes da América do Norte e América Central. Para Tospovirus, foram observadas variações semelhantes. Um isolado brasileiro de *Iris yellow spot virus* (IYSP) encontrado infectando campos de cebola, diferiu em quase 10 % da espécie tipo isolada em plantas de iris na Holanda (Posser et al., 1999).

Também uma árvore de identidade de aminoácidos foi elaborada (Figura 10). Nela é possível observar que todas as espécies comparadas descendem de um mesmo tronco. O percentual de identidade mínimo foi de 76,6 %.

Ainda na Figura 10 observa-se que GarV-A e GarV-D reuniram-se em um mesmo grupo, como em Sumi et al. (1993) e Koo et al. (2002), entretanto, a primeira espécie está mais próxima de GarMbFV que a segunda. Isso reforça a hipótese de que o surgimento de GarMbFV possa ter ocorrido por evolução a partir de GarV-A.

Os meios e o período relativos à entrada das espécies de *Allexivirus* no Brasil continuam obscuros. Pode-se especular que a via de entrada possa ter sido em função das importações de alho da Europa, da Ásia, ou mesmo da Argentina, uma vez que a cultura foi introduzida no Brasil pela importação de material de propagação vegetativa importado de diversos países. Neste aspecto, van Dijk et al., 1991 já reportavam a existência de *Allexivirus* em amostras de cebola provenientes da China e de alho oriundas da Espanha, que segundo Nakamae & Pastrello (2002), são dois dos principais exportadores para o Brasil. Apesar das importações serem destinadas ao consumo, parte dos bulbos tem sido empregada como material de plantio (Nakamae & Pastrello, 2002). Isto poderia ter colaborado para o estabelecimento dessas espécies no país.

Para GarMbFV, até hoje só reportado na Argentina e no Brasil, a via de introdução poderia ter sido pela importação de alho daquele país, ou o contrário.

Apesar das diferenças verificadas entre os isolados brasileiros, argentinos e japoneses, considerando-se os critérios estabelecidos pelo ICTV para diferenciar espécies de *Allexivirus* (menos de 90 % de identidade na seqüência de aminoácidos da capa protéica; menos de 90 % de identidade na seqüência de nucleotídeos na região 3' não codante do genoma completo e diferentes reações a anti-soros), não se pode sugerir que os isolados brasileiros sejam espécies diferentes dentro do gênero. Devem ser considerados novos isolados das mesmas espécies comparadas.

Por fim, o seqüenciamento da capa protéica dos isolados brasileiros de *Allexivirus* permitiram ainda, e de imediato, o desenvolvimento de mais uma ferramenta de detecção para este gênero. Foi possível a produção de sondas moleculares não-radioativas capazes de hibridizar com fragmento da capa protéica de GarMbFV, GarV-C e GarV-D, clonados em plasmídeo, cujos resultados são comentados a seguir.

O uso de sondas não-radioativas mostrou-se promissor para detecção das três espécies de *Allexivirus* clonadas em plasmídeo e para a detecção específica de pelo menos uma das espécies de *Allexivirus* que infectam alho no Brasil.

A hibridização com fragmento contendo isoladamente o gene da CP das três espécies detectadas no país resultou em mais uma ferramenta de detecção e identificação de *Allexivirus*. Das três sondas produzidas, as sondas 1 e 3 podem ser empregadas como sondas capazes de detectar as três espécies do gênero ora seqüenciadas no país (Figura 8). A sonda 1 foi capaz de hibridizar até a concentração de 1 ng/μl com GarMbFV Br e até 0,1 ng/μl com GarV-C Br, diferentemente da sonda 2 que hibridizou com GarMbFV Br apenas a 10 ng e com GarV-C Br até 1 ng. A sonda 2, por não hibridizar com GarMbFV Br nem com GarV-D Br, e em nenhuma das concentrações testadas (Figura 8), permitiu separar GarV-C Br das demais.

Uma vez que os oligonucleotídeos ora sintetizados e empregados na produção das referidas sondas apresentaram potencial para anelamento na seqüência de nucleotídeos da CP das espécies de *Allexivirus* ainda não seqüenciadas no Brasil (Figura 11), estes podem ser considerados também promissores para a detecção e seqüenciamento destas espécies.

Assim como Fajardo (1998), que produziu sondas capazes de identificar OYDV, LYSV e GarCLV a partir de sondas sintetizadas para anelar em regiões menos conservadas da CP dessas espécies, a mesma estratégia pode ser empregada para as espécies de *Allexivirus*. Nesse sentido, observando-se a Figura 11, percebe-se que uma maior especificidade de sondas capazes de detectar GarMbFV Br, GarV-C Br e GarV-D Br, poderá ser obtida sintetizando-se oligonucleotídeos forward para anelar em regiões menos conservadas da CP a serem utilizados com o oligonucleotídeo AllexU-2 reverso no processo de confecção das referidas sondas. Para GarMbFV Br, o oligonucleotídeo forward pode ser sintetizado a partir do nucleotídeo de número 490 da seqüência da CP dessa espécie (Figura 11). Para GarV-C Br, esse mesmo oligonucleotídeo pode ser sintetizado a partir do nucleotídeo de número 51 (Figura 11) e para GarV-D Br a partir do nucleotídeo 148.

O mesmo raciocínio deve ser empregado para produção de sondas capazes de detectar GarV-A e GarV-B. Nesse caso, oligonucleotídeo forward seria sintetizado a partir do centésimo décimo quinto nucleotídeo da seqüência da CP do GarV-A (Figura 11) e a partir do primeiro nucleotídeo para GarV-B. Assim, espera-se aumentar as chances de hibridização específica para as espécies de *Allexivirus* mencionadas.

No ano de 2003, foi desenvolvida a atividade de expressão da proteína capsidial de GarMbFV e GarV-C in vitro em um sistema baseado em baculovírus e a produção de um anti-soro policlonal com a proteína expressa de GarV-C.

Vírus e Células Utilizados

O baculovírus selvagem *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e os vírus recombinantes vSyngalVI, vSynGarMb e vSynGarV-C (produzidos nesse trabalho) foram propagados em células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4) em cultura. As células foram mantidas em meio TC-100 (Gibco-BRL) suplementado com 10 % de soro fetal bovino a 27 °C.

Células de *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen) foram usadas como hospedeiras para os plasmídeos usados no trabalho.

Construção do vetor de transferência contendo os genes capsidiais de GarMbFV e GarV-C

O vetor de clonagem pGEM-T (Promega) contendo o gene da capa protéica das espécies GarMbFV e GarV-C, respectivamente, pGEMGarMb e pGEMGarV-C foram digeridos com a enzima de restrição *Hind* III, seguindo as instruções do fabricante (Pharmacia Biotech). O resultado da digestão (fragmento de ~ 800 pb) foi separado em gel de agarose a 0,8 %. As bandas referentes aos genes capsidiais de GarMbFV e GarV-C foram eluídas dos géis utilizando-se Resina SephaglasTMBandprep Kit (Pharmacia) seguindo as recomendações do fabricante e, posteriormente, ligadas ao vetor pBluescript SK (+/-) (Stratagene), previamente digerido com a mesma enzima de restrição originando os vetores intermediários pBsGarMb e pBsGarV-C. Esses vetores foram amplificados em *E. coli* (Invitrogen) e purificados pelo kit de extração de DNA plasmidial Concert, seguindo as instruções do fabricante (Gibco-BRL). A orientação dos genes foi confirmada via sequenciamento empregando seqüenciador marca MEGA BACE 1000 da Amersham Biosciense, pelo serviço de sequenciamento automático do laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília. O sequenciamento foi realizado nas duas fitas de DNA utilizando os primers universal (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') e reverso (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3') e repetido por três vezes. Após a confirmação dos clones positivos, estes foram digeridos com as enzimas de restrição *Sal* I e *Bam* HI e clonados no vetor pSynXIVVI \rightarrow X3 previamente digerido com as enzimas de restrição *Sal* I e *Bgl* II formando assim, os plasmídeos recombinantes pSynGarMb e pSynGarV-C que foram utilizados na co-transfecção com o vírus vSyngalVI- (Figura 12).

Construção e purificação dos baculovírus recombinantes vSynGarMb e vSynGarV-C

Células de *T. ni* foram co-transfectadas com 1 µg do DNA do plasmídeo recombinante (pSynGarMb) e 0,5 µg do DNA linearizado do vírus vSynGalVI- (digerido com a enzima *Bsu* 36I, que possui sítio único no gene β-galactosidase, *lac-z*), usando uma solução de lipossomos (Lipofectin, Gibco-BRL). Células BTI-Tn5B1-4 (1×10^6 células) foram transferidas para uma placa de 60 mm em diâmetro por pelo menos 1 h, para a formação de monocamadas de células. O DNA plasmidial e viral foram diluídos em 0,5 ml de meio TC-100 sem soro em uma placa de 35 mm em diâmetro. Vinte microlitros de lipofectina foram diluídos em 0,5 ml de meio TC-100 sem soro, misturados à solução contendo o DNA e incubados por pelo menos 10 min à temperatura ambiente. O meio de cultura das células foi substituído pela mistura de DNA/lipossomos e a placa incubada a temperatura ambiente por 3 h. Após esse período, a mistura foi trocada por meio TC-100 novo, contendo 10 % de soro fetal bovino e as células incubadas a 27 °C por sete dias. Dentro das células de inseto, ocorreu recombinação homóloga entre regiões flangeadoras do gene de interesse, no vetor de transferência, e as regiões homólogas no genoma do vírus vSynGalVI-, que flanqueiam o gene da β-galactosidase e o genoma circular. Utilizou-se o vírus vSynGalVI-, digerido com a enzima *Bsu* 36I, com o genoma na forma linear, não infectiva em células de inseto. Desta forma, após a recombinação homóloga, somente os vírus recombinantes estão na forma circular e infectiva, facilitando a purificação do recombinante. O sobrenadante das células transfectadas (sete dias após a transfecção) foi usado para purificar os vírus recombinante vSynGarMb e vSynGarV-C pelo método de diluição seriada em placas de 96 poços. Três ciclos de purificação em placas de 96 poços foram necessários para a purificação de cada um dos vírus recombinante e a sua identificação se deu pela presença de corpos de oclusão no núcleo das células infectadas.

Purificação do DNA viral e análise por PCR

Células de BTI-Tn5B1-4 (1×10^6 /placa de 60 mm) foram infectadas com 10 vírus (pfu)/célula dos vírus recombinantes vSynGarMb e vSynGarV-C. Setenta e duas horas pós infecção (h.p.i.), o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 12.000 g por 15 min. Fez-se o descarte do sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso no tampão "vírus disruption buffer" (10 mM Tris-HCl pH7.5; 10 mM EDTA, 0,25 % SDS), acrescido de proteinase K na concentração de 500 µg/ml e incubado a 37 °C por pelo menos 16 h. O

DNA viral foi extraído com fenol e fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado com 1/10 do volume inicial de acetato de sódio 3M, pH 5.2 e 2,5x o volume inicial de etanol absoluto e incubado a -20 °C por 24 h. Na seqüência, a mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 min e o sedimento lavado com 100 µl de etanol 70 %. O DNA foi ressuspendido em 30 µl de água milli-Q e utilizado nas reações de PCR. Foram utilizados os oligonucleotídeos ORF 603 (5'-CAgCCATTgTAATgAgACg-3') e POL R (5'-CAACAACgCACAgAATCTAg-3'), que amplificam o gene inteiro da poliedrina.

A amplificação dos fragmentos de DNA se baseou pelos pares de oligonucleotídeos definidos na Tabela 2. As amostras foram submetidas à reação de PCR no termociclador "Gene Amp PCR System 2400" (PERKIN ELMER). As reações foram aquecidas a 94 °C por cinco min, passando a seguir por 30 ciclos, sendo cada um composto de desnaturação das fitas (94 °C/1 min), anelamento (53 °C/90 seg) e extensão (72 °C/90 seg). Concluídos os 30 ciclos, a temperatura permaneceu por sete minutos a 72 °C para o término da extensão pela *Taq* DNA polimerase. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1 %.

Análise da expressão da proteína capsidial em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e Western blot

O padrão protéico resultante da expressão dos vírus recombinantes vSynGar:Mb e vSynGarV-C foram avaliados 72 h.p.i. As células BTI-Tn5B1-4 infectadas com 10 pfu/células foram centrifugadas a 5.000 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento de células foram adicionados 100 µl de tampão PBS, juntamente com 100 µl tampão de amostra de proteína acrescido de 10 µl de DDT 1M e incubadas a 95 °C por 5 min. Em seguida, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 12 % (SDS-PAGE). O gel foi corado em solução com 40 % de metanol, 10 % de ácido acético e Comassie blue 0.1 %, por 40 min e descorado em solução com 40 % de metanol e 10 % de ácido acético por 1 h. A técnica de Western blot foi utilizada, onde as frações antigênicas, separadas por eletroforese, foram transferidas eletroforeticamente, do gel à membrana de nitrocelulose (Hybond™ – C pure) (Amersham). Para tanto, foram utilizados os aparatos de transferência da BioRad (Trans-Blot® SD – Semi Dry Transfer Cell, para transferência semi-seca), de acordo com o protocolo do fabricante e com tampão de transferência (25 mM Tris + 192 mM glicina + 20% metanol, pH 8.2). As membranas foram processadas e

reveladas como no teste de Dot-ELISA utilizando anti-soros monoclonais provenientes do Japão contra GarMbFV e GarV-C.

Produção de anti-soro policlonal contra GarV-C

Um polipeptídeo de aproximadamente 32 kDa correspondente ao gene da capa protéica de GarV-C foi extraído do gel de poli-acrilamida e triturado na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. A este pó foram adicionados cerca de 400 µl de água milli-Q estéril e 400 µl de adjuvante incompleto de Freund. O material foi injetado em coelho via subcutânea em quatro pontos no dorso do animal. Foram realizadas três imunizações, com intervalo de 10 dias entre cada uma e as sangrias iniciaram-se 30 dias após a primeira injeção. As demais efetuadas semanalmente, coletando-se aproximadamente 10 ml em cada sangria. A análise do anti-soro foi realizada pelo teste Dot-ELISA, com o anti-soro bruto nas diluições 1:2.500, 1:5.000 e 1:10.000, com extrato de plantas infectadas diluído de 1:10, 1:100 e 1:1.000. Foi utilizado o extrato da cultura de células transformadas 1:100 como controle positivo.

Clonagem dos genes capsidiais de GarMbFV e GarV-C

A análise da seqüência de nucleotídeos dos genes capsidiais de GarMbFV e GarV-C clonados no vetor intermediário pBluescript, confirmou a orientação correta dos genes, quando comparadas com as seqüências já obtidas. Os genes capsidiais foram clonados no vetor intermediário pBluescript apenas para a adição de sítios de restrição compatíveis com os do plasmídeo pSynXIVVI+X3. Esse vetor intermediário foi digerido com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Sal* I e os fragmentos liberados foram visualizadas em gel de agarose a 0,8 % (Figura 13A) em seguida foram clonados no vetor de transferência pSynXIVVI+X3, digerido com as enzimas *Bgl* II e *Sal* I, dando origem aos vetores pSynGarMb e pSynGarV-C (Figura 12A e B).

A confirmação da introdução dos insertos no vetor pSynXIVVI+X3 foi realizada através da digestão de 5 µl dos plasmídeos com as enzimas *Bam* HI e *Sal* I e a visualização dos fragmentos de tamanho esperado (~ 1.400 pb) em gel de agarose a 0,8 % (Figura 13B). O sítio de restrição *Bam* HI estava presente no gene da poliedrina e o sítio de *Sal* I, presente no final dos genes capsidiais.

Construção e purificação dos baculovírus recombinantes vSynGarMb e vSynGarV-C

Os vetores pSynGarMb e pSynGarV-C, contendo os genes capsidiais de GarMbFV e GarV-C respectivamente, foram co-transfectados com DNA do vírus vSyngalVI- em células de BTI-Tn5B1-4 (uma reação para cada vetor). Como resultado, foi verificado dentro das células de inseto recombinação homóloga entre as regiões do plasmídeo vetor e do genoma viral, ocorrendo a troca de regiões homólogas entre os dois DNAs. Como o vírus usado na co-transfecção possui o gene *lac-Z* no lugar do gene da poliedrina, não produz corpos de oclusão (OB) nas células infectadas. O plasmídeo vetor possui, além do gene de interesse (gene da capa protéica de GarMbFV ou GarV-C), o gene da poliedrina e regiões flangeadoras homólogas à região da poliedrina no genoma viral. Dessa forma, o vírus recombinante é capaz de expressar poliedrina e produzir os OB em células infectadas. Logo, a purificação do vírus recombinante se deu pela observação de OB nas células infectadas com o sobrenadante da co-transfecção e das diluições em placas de 96 poços. A análise em gel de agarose confirmou a inserção do genes dos dois vírus estudados.

Purificação do DNA viral e análise por PCR

DNA dos vírus recombinantes vSynGarMb e vSynGarV-C purificados com proteinase K, foram utilizados como moldes para as reações de PCR para detecção da inserção dos genes capsidiais com os primers ORF 603 e POL R. Análise eletroforética dos fragmentos obtidos por PCR revelaram a presença de uma banda por volta de 2000 bp relativa aos genes capsidiais e da poliedrina somente no DNA dos vírus recombinantes (Figura 13C).

Análise da expressão das proteínas capsidiais de GarMbFV e GarV-C

Foi observado em células de *T. ni*, infectadas com os recombinantes vSynGarMb e vSynGarV-C, a presença de um polipeptídeo ausente na infecção com os baculovírus AcMNPV e vSyngalVI-, correspondente a uma proteína de aproximadamente 32 kDa, em SDS-PAGE, a partir de 72 h.p.i (Figura 14A). Através de Western blot, com anti-soros provenientes do Japão capazes de detectar as espécies GarMbFV e GarV-C. Foi confirmada uma similaridade imunológica entre as proteínas de 32 kDa aqui expressas e a proteína capsidial das espécies GarMbFV (Figura 14B) e GarV-C. A proteína capsidial das espécies do gênero *Allexivirus* com 28 kDa, pode migrar em géis de SDS-PAGE de 32 a 36 kDa. Altos níveis de expressão dessa proteína foram verificados com os recombinantes aqui construídos.

Produção de anti-soro policlonal contra GarV-C

Uma seqüência de nucleotídeos referente ao gene da CP de GarV-C foi inserido dentro do genoma de AcMNPV e expresso em extratos de células 72 h.p.i (Figura 14A). Uma proteína de aproximadamente 32 kDa correspondente a CP da espécie em questão foi confirmada através de Western blot, como sendo imunologicamente similar à proteína capsidial de GarV-C. Essa proteína, purificada, serviu para imunizar um coelho e produzir um anti-soro contra a espécie GarV-C. O anti-soro bruto produzido reagiu em Dot-ELISA, com a proteína purificada do vírus e com uma amostra de alho proveniente do campo. Neste último caso, em baixa intensidade. Não houve reação com extratos de plantas sadias ou reação cruzada com amostras infectadas com OYDV (Figura 15). O anti-soro, mostrou-se bastante específico, mas com título baixo. O baixo peso molecular da proteína capsidial das espécies de allexivírus quando comparados com a partícula íntegra, pode influenciar na resposta imune.

A produção de anti-soros específicos contra as espécies de vírus envolvidas no complexo viral do alho, visa aumentar a qualidade do alho produzido no Brasil e subsidiar o estabelecimento de programas de produção de bulbos sementes livres de vírus. Produzir anti-soros específicos contra *Allexivirus* a partir de vírus purificado é difícil, dada a complexidade de se isolar espécies em particular e também devido ao baixo título de vírus nas plantas infectadas. Geralmente são produzidos anti-soros polivalentes capazes de detectar infecções múltiplas em plantas com o complexo viral. Uma das alternativas para se aumentar o peso molecular da proteína capsidial em questão, seria utilizando a estratégia de se ligar a proteína purificada a argila.

A expressão em larga escala das proteínas capsidiais de GarMbFV e GarV-C, com artefatos para aumentar a imunogenicidade será continuada.

Em 2004, foi desenvolvido um protocolo de construção de vetor de expressão em Baculovirus com maior nível de expressão para proteínas de vírus de alho, que poderá ser empregada para qualquer gene viral.

Foi realizada a clonagem do pXIGarMb no plasmídeo p2100O plasmídeo pSynGarMb, contendo o gene GarMb sob o comando do promotormodificado da poliedrina pXIV (Wang et al., 1991), foi digerido com as enzimas de restrição Sac I e Eco RV, seguindo as instruções do fabricante (Pharmacia), por 3 horas, e o resultado da digestão separado em gel de agarose 0,7%. A banda correspondente ao gene GarV-C mais o promotor pXIV (~1,1 pKb) foi purificada do gel, usando o kit de extração de DNA GFX (Amersham) e, posteriormente, ligado ao plasmídeo p2100 previamente digerido com a enzima de restrição Eco RV, por meio do kit rapid DNA

Ligation Kit, de acordo com as instruções do fabricante (Roche). A ligação foi então usada para transformar células competentes de *E. coli* (DH5a Invitrogen). As colônias de *E. coli* crescidas em meio L-ágar, contendo ampicilina (100mg/mL), foram inoculadas em tubo de ensaio, contendo 5 mL de meio LB mais ampicilina (100mg/mL), e foram inoculadas em tubo de ensaio, e incubados por 12 horas a 37°C sob agitação (200 r.p.m.). Uma alíquota de 100µl das colônias foi transferida para um tubo de microcentrifuga, a amostra foi centrifugada a 14.000 r.p.m. por 3 minutos, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em 20 µl de água mili-Q autoclavada, o mesmo volume de fenol-clorofórmio foi adicionado ao tubo e misturado vigorosamente. A mistura foi centrifugada a 14.000 r.p.m. por 5 minutos e 10 µl da fase superior, contendo o DNA plasmidial, foi coletada e usada para análise em gel de agarose 0,8%. As colônias que apresentavam DNA plasmidial com tamanho superior ao fragmento de ~ 5,1 kpb foram selecionadas e o DNA plasmidial foi purificado usando o kit de extração de DNA plasmidial Concert, seguindo as instruções do fabricante (Gibco-BRL).

Construção e purificação dos baculovírus AgMNPV recombinantes.

Células de UFL-AG-286 foram co-transfectadas, separadamente, com 1mg do DNA dos plasmídeos recombinantes (...) e 0,5 mg do DNA do vírus AgMNPV, usando uma solução de lipossomos (Lipofectin, Gibco-BRL). Células UFL-AG-286 (1 x 10⁶ células) foram transferidas para uma placa de 35 mm de diâmetro (TPP) por pelo menos 1 hora, para a formação de monocamadas de células. O DNA plasmidial e viral foram diluídos em 0,5 mL de meio TC-100 sem soro em uma placa de 35 mm de diâmetro. Vinte microlitros de lipofectina foram diluídos em 0,5 mL de meio TC-100 sem soro, misturados à solução contendo o DNA e incubados por pelo menos 10 minutos à temperatura ambiente. O meio de cultura das células foi substituído pela mistura de DNA /lipossomos e a placa incubada a temperatura ambiente por 3 horas. Após esse período, a mistura foi trocada por meio TC-100 novo, contendo 10% de soro fetal bovino e as células incubadas a 27°C por sete dias. O sobrenadante das células transfectadas (7 dias após a transfecção) foi usado para purificar o vírus recombinante pelo método de diluição seriada em placa de 96 poços, como descrito em O'Reilly et al. (1992).

Clonagem do cassete gênico pXIVGarMb no plasmídeo p2100.

Para a clonagem do cassete gênico pXIVGarMb no plasmídeo p2100, primeiramente, o plasmídeo pSynGarMb, contendo o gene do GarMb, foi digerido com as enzimas de restrição Sac I e Eco RV, o gene do GarMb sob o comando do promotor pXIV, foi removido e clonado no plasmídeo p2100, previamente digerido com a enzima Eco RV e defosforilado, dando origem ao vetor p2100GarMb.. A confirmação da introdução do gene GarMb no plasmídeo p2100, foi realizada através da digestão do plasmídeo com a enzima de restrição Hind III (Figura 16).

Construção do vírus recombinante:

O vAgGarMb vetor p2100 foi usado para a clonagem do gene GarMb com o promotor pXIV. Esse plasmídeo vetor possui, além do gene de interesse (gene da capa protéica do vírus do alho), o gene da poliedrina no genoma viral. A co-transfecção foi feita com o DNA do vírus selvagem vAgGal (apresenta o gene lac-Z no lugar do gene da poliedrina) em células UFL-AG-286. Dessa forma, o vírus recombinante é capaz de expressar a poliedrina e produzir os OB em células infectadas. Após a co-transfecção do vetor com o DNA do vírus vAgGala2 em células de UFL-AG-286, estamos purificando vírus recombinante apresentando poliedros.

Sondas moleculares:

Sobre o uso de sondas, estamos tentando recuperar todos os genes (OYDV, LYSV, GCLV e os allexivirus) para termos plasmídeos padrões e sondas totalmente reproduzíveis para marcação, não afetando assim, a estabilidade do método pela qualidade da sonda. O grande problema esta na dificuldade de comprarmos o melhor kit do mercado para detecção via sondas não radioativas por quimioluminescência que é a mais sensível. Não existem mais firmas representantes no país desse tipo de kit.

Publicações

MELO FILHO, P. DE A., DUSI, A. N. & RESENDE, R. DE O.; Detecção sorológica de *Garlic Virus A* (GarV-A) em plantas de alho apresentando sintomas de infecção por vírus. Summa Phytopathologica. v. 28, n.1:100. 2002. Resumo?

MELO FILHO, P.A., DUSI, A.N., TORRES, C.A. & RESENDE, R.O. Gradiente de reinfecção em plantas de alho pelo complexo viral comumente associado à cultura

após seis exposições em campo. Anais do 7º Simpósio Brasileiro de Patologia de Semente. Sete Lagoas. Embrapa Milho e Sorgo. P. 58. 2002.

MELO FILHO, P.A., DUSI, A.N. & RESENDE, R.O. Serological detection and characterization of *Garlic virus B* (GarV-B) (*Allexivirus*) associated to garlic plants in Minas Gerais and Goiás. *Virus: Reviews and Research*. v.07, n. 0:157. 2002.

Patentes

Não se aplica

Tecnologia, Serviços e Produtos

Não se aplica

Transferência de Tecnologia e de Conhecimentos

Não se aplica

Planejado/Realizado

Metas fins constantes no projeto

1. Identificação de vírus e seqüenciamento de genoma viral de no mínimo dois vírus novos em alho; dezembro de 2004;
2. Produção de anti-soro policlonal de OYDV, LYSV, GCLV e Allexivirus para uso em controle de qualidade na produção, na técnica de Elisa ; dezembro de 2004;
3. Produção de sondas não radioativas para detecção de dois novos vírus adicionais em alho; dezembro de 2004;
4. Desenvolvimento do sistema de detecção via sondas moleculares em extrato bruto de plantas infectadas com uso de sonda não radioativas para detecção dos vírus OYDV, LYSV, GCLV e Allexivirus; dezembro de 2004.
5. Elaboração de dois trabalhos científicos completos para submissão à revistas indexadas , dezembro de 2003 e dezembro de 2004;
6. Apresentação de um resumo anualmente em congressos de sociedades científicas, agosto de 2002, agosto de 2003 e agosto de 2004;

Resultados:

As metas foram atingidas, exceto a meta 4, que foi alcançada parcialmente. As

atividades terão continuidade para conclusão dos trabalhos em novo projeto a ser proposto.

Equipe Técnica

Universidade de Brasília:

Renato de Oliveira Resende, membro, 10%

Péricles Albuquerque de Melo Filho, membro, 50% (aluno da pós-graduação)

Bergman Moraes Ribeiro, 5%

Embrapa Hortaliças:

} André Nepomuceno Dusi, responsável, 5%

} Antonio Carlos Torres, membro, 5% P 82522

} Francisco Vilela Resende, membro, 5%

Avaliação Global do Andamento: Concluído

Situação Geral do Subprojeto

Avaliação do responsável: Concluído.

Avaliação do líder (quantitativa): 10

Os testes com suco bruto de plantas não apresentaram resultados satisfatórios (dados não mostrados). Estes deverão ter continuidade visando o desenvolvimento de um método adequado para uso em extrato bruto.

O trabalho permitiu o seqüenciamento da capa protéica dos isolados brasileiros de GarMbFV, GarV-C e GarV-D com conseqüente estabelecimento de um sistema de detecção de *Allexivirus* via RT-PCR no Brasil. Todos os vírus foram detectados em plantas originárias de campo apresentando infecção natural.

A reação cruzada apresentada pelo anti-soro específico para GarV-A com GarMbFV Br não é incomum para diferentes vírus de plantas quando se usam anti-soros policlonais. Embora as técnicas de sorologia sejam as mais empregadas na diagnose de vírus de plantas, podem apresentar conclusões errôneas sobre a presença de uma determinada espécie de vírus devido à reações cruzadas ou falso positivo (Almeida & Lima, 2001). Ainda segundo esses autores, isto pode ocorrer entre diferentes espécies de vírus devido à elevada semelhança de epitopos existentes na CP, o que explica nosso resultado e evidencia a necessidade do seqüenciamento genético para a caracterização precisa da identidade dos *Allexivirus* existentes no Brasil.

Em análise filogenética elaborada por Sumi et al. (1993), comparando a seqüência de aminoácidos de espécies de *Allexivirus*, *Potexvirus* e *Carlavirus*, foi formado um grupo filogenético específico para os *Allexivirus*. Neste grupo, foram formados dois sub-grupos, nos quais, o primeiro reuniu as espécies GarV-A e GarV-D e o segundo, GarV-B e GarV-C. Isto comprova a existência de diferenças moleculares entre as espécies citadas. Trabalho mais recente desenvolvido na Coréia (Koo et al., 2002) também comparando a seqüência de aminoácidos da CP de espécies de *Allexivirus*, mostrou a formação de três grandes grupos. Um distinto para GarV-X, GarV-B e GarV-C, outro para GarV-A, GarV-D e GarV-E, onde neste, GarV-D localizou-se em um sub-grupo isolado de GarV-A e GarV-E e um terceiro para ShV-X. Concordando com Sumi et al. (1993) e Koo et al. (2002), a análise filogenética dos isolados brasileiros, comparando-se a seqüência de aminoácidos da CP, também resultou na separação dos isolados de GarV-C Br e GarV-D Br em grupos distintos, entretanto, GarV-D apresenta-se separado de GarV-A como verificado pelo segundo autor (Figura 9).

Este resultado mostra ainda que as espécies de GarV-B e GarV-C, independentemente dos isolados comparados, são filogeneticamente mais distantes do GarMbFV brasileiro e argentino que o GarV-A (Figura 9). Os estudos recentes


```

601 TTCAAACCCCACAGATGCTGAAATTCTCGCACATTCCATGAACGCCAAGAT 650
      . . . . .
651 GTCCATTGTGGAGTCCAGACGAGCCACTAATATGGTGTCAACCCGTGCGG 700
      |||
651 GTCCATTGTGGAGTCCAGACGAGCCACTAATATGGTGTCAACCCGCGCGG 700
      . . . . .
701 ACCTACTTGCACAACAACAATCCATGAACAGCCGAAACCTCCCATGATT 750
      |||
701 ACCTACTTGCACAACAACAATCCATGAACAGCCGAAACCTCCCATGATT 750
      . . . . .
751 ACGTTCTGATGA 762 3
      |||
751 ACGTTCTGATGA 762

```

Figura 1. Alinhamento da seqüência de nucleotídeos da capa protéica de isolados de *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV) encontrados no Brasil e Argentina (Acesso X98991). Letras em negrito representam sítio de *Hind III*.

Tabela 1. Porcentagem de identidade na seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da capa protéica de isolados brasileiros, japoneses e argentino de *Allexivirus*.

Isolados brasileiros argentino	Isolados japoneses								Isolado	
	GarV-A*		GarV-B*		GarV-C		GarV-D		GarMbFV	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
GarMbFV Br	-	89	-	64	-	65	-	75	96,6	96,6
GarV-C Br	-	63	-	70	92,3	95	-	65	-	64
GarV-D Br	-	76	-	65	-	64	92,6	96,8	-	75

* - Espécies não seqüenciadas no Brasil, 2002.

nt - nucleotídeos.

aa - aminoácidos

Brasil - 5 1 ATGAGTGAAGACAGCCTATCAGACGAGCTAGTGGATGCTGTCATGAACGA 50
 ||||| ||||||||| ||||| || ||| ||||| ||||| ||

Japão - 7115 ATGAGTGGAGACAGCCTATCTGACGATCTCGTGAATGCTGCCATGACTGA 7164

 51 CCCGTCAACTCAGGGACTGAGTCAGGCCACATCTGCCAGGGTTCTAGAC 100
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

7165 CCCGTCAACTCAGGGATTGAACCAGGCCACGTCTGCCAGGGATCAAGAC 7214

 101 CGGGACTTGTGTCCGGACCAGGTTTCGCAAGCGCCTAACAAGAACCCTAGA 150
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

7215 CGGGACTTGTATCCGGACCAGGTTTCAAAACGCCTAGCAAGAATCCCAGA 7264

 151 CCATCTTCTACACAAGGTGGACCGGCTGTCACAAATGAATTGTTGCCGAG 200
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

7265 CCATCCTCTACGCAAGGTGGACCGACTGTCACAAATGAATTGTTGCCGAG 7314

 201 TGAATCTGAGTTGGAGGCGGGAGCGAATGATGTCACATCGAATCCGTAG 250
 ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

7315 TGAGTCTGAGCTGGAGGCGGTAGCGAATGACGTCACATCGAATCCGTAG 7364

 251 CTACGCAGAGCACAATTTCGCGAAATCCTAGACCTTGCTTCGTGCACGTAA 300
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

7365 CTACACAGAGCACAATTTCGCGAAATCCTAGACC.TACTTCGCGCACGCAA 7413

 301 GCCAAACGCTTCGCCAAAAGACCTCTTTTCCCTTGCATGGGCTTGCTACC 350
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

7414 GCCAAGCGCTACGCCAAAAGACCTCTTTTCCCTTGCATGGGCTTGCTACC 7463

 351 ATAATGGTTCCTCCAGGTACACCAACCTCGCCACGGATGCACCGTGTGGA 400
 | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

7464 ACAATGGTTCCTCCAGGTATACCAACCTAGCCACGGATGCGCCGTGTGGA 7513

 401 ATGTCTCAGCCGAGCTCAAAGACCTTGTGAGGAGTTTTGCACITTTACG 450
 ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

7514 ATGTCTCATGCAGAGCTCAAAGACCTTGTGAGGAATTTGCACCTTACG 7563

 451 ACAATTCTGCGGGTTTTATGCGAAAACCTTGTACGTGACTGGACGACAGC 500
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

7564 ACAATTCTGCGGGTTTTATGCGAAAACCTTGTACGTAAGTGGACGACAGC 7613

 501 AGAACAAACCACCAGCAAATTGGGCAAGGAAAGGATTCAGGATGAGTCG 550
 ||||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

7614 AGAATAAATTACCAGCAAATTGGGCAAGGAAAGGATTCAGGATGAGTCG 7663

 551 AAATTTGCTGCTTTTGATTTCCTTAATGCAATGTCCAGTACTCGCCCC 600
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

7664 AAATTTGCTGCTTTTGATTTCCTTAACGCAGTGTGAGCGACTCAGCCCC 7713

 601 AAACCCACCTGGCGGCATGCGCTTCAAACCTACACAAGCGGAAATCTTG 650
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

7714 AAACCTCCTGGCGGCATGCGCTTAAACCTACGCAAGCAGAAATCTTG 7763

 651 GGCACCTCCCTAAACGCCAAAATGTCAATCATCGAATCACGCAAGGCCACC 700


```
|||||
701 TTGCACAACAACAGATACATGAACAACCCAAGCCACCAATGATCACATTC 750
1909 TAA 1911 31
    |||
751 TAA 753
```

Figura 5. Alinhamento da seqüência de nucleotídeos da capa protéica de isolados de *Garlic virus D* (GarV-D) encontrados no Brasil e Japão (Acesso AB010303).

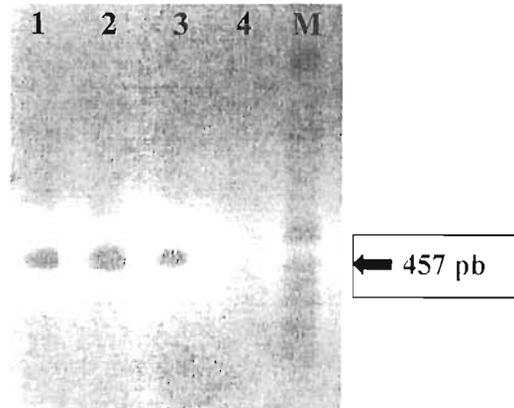


Figura 7. Padrão eletroforético de fragmentos amplificados por RT-PCR obtido com oligonucleotídeos para amplificação da capa protéica de três espécies brasileiras de *Allexivirus*. (1) *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV Br), (2) *Garlic virus C* (GarV-C Br) , (3) *Garlic virus D* (GarV-D Br), (4) planta sadia (controle negativo) e (M) marcador 1 Kb ladder.

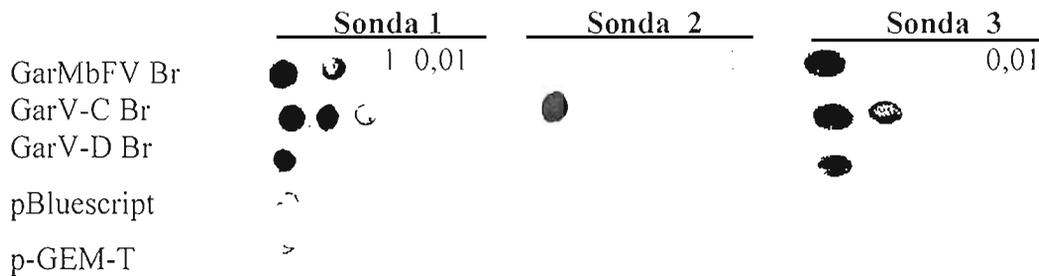


Figura 8. Hibridização em membrana de náilon com sondas não-radioativas produzidas por PCR a partir do gene da CP de *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV Br), *Garlic virus C* (GarV-C Br) e *Garlic virus D* (GarV-D Br). As amostras foram testadas nas concentrações de 10 ng de fragmento por μl , 1 ng/ μl , 0,1 ng/ μl e 0,01 ng/ μl .

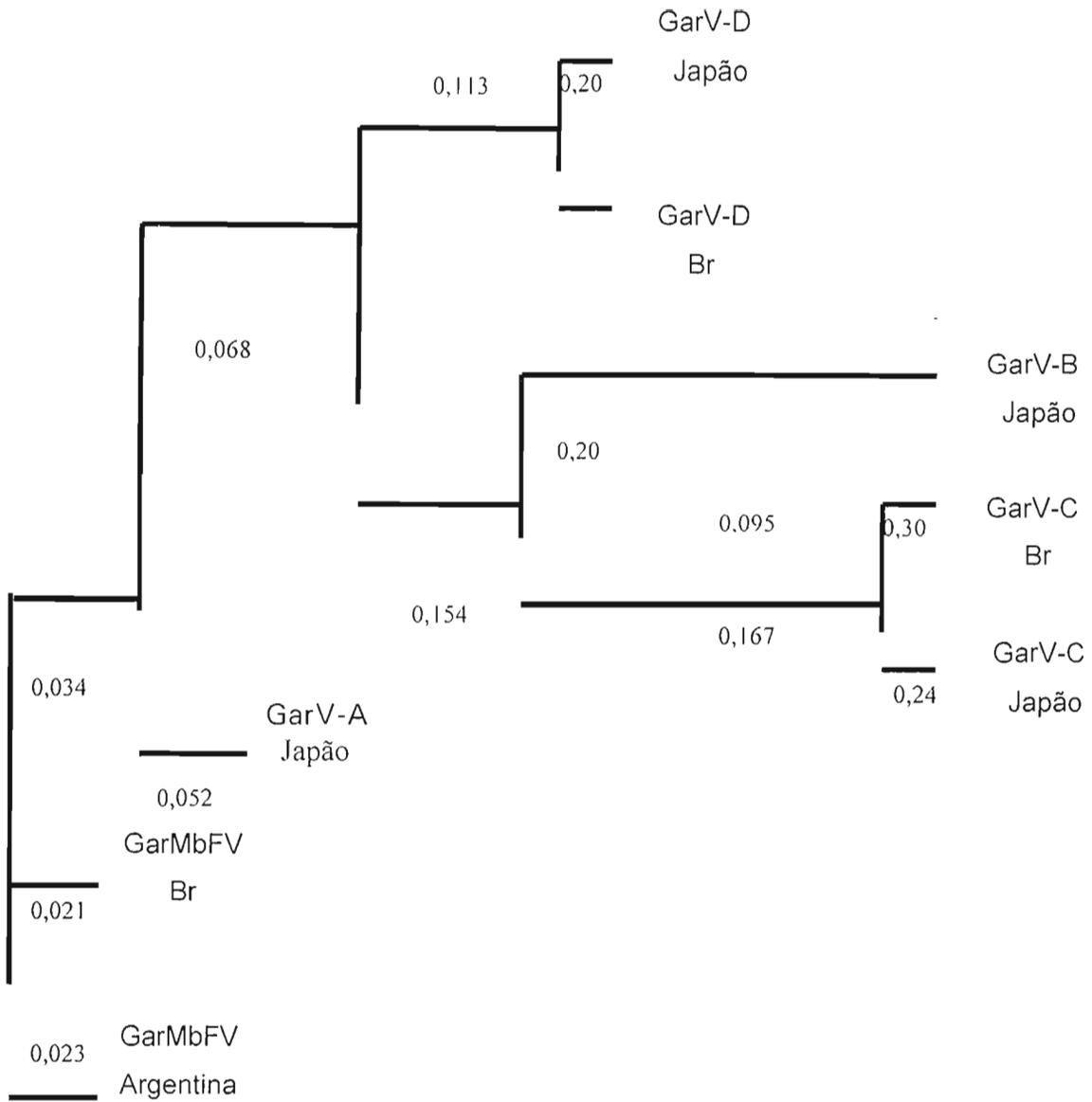


Figura 9. Árvore filogenética da seqüência de aminoácidos da capa protéica de espécies de *Allexivirus*. A análise filogenética foi feita com DNAMAN 4.0. Os valores indicam a distância filogenética entre as espécies.

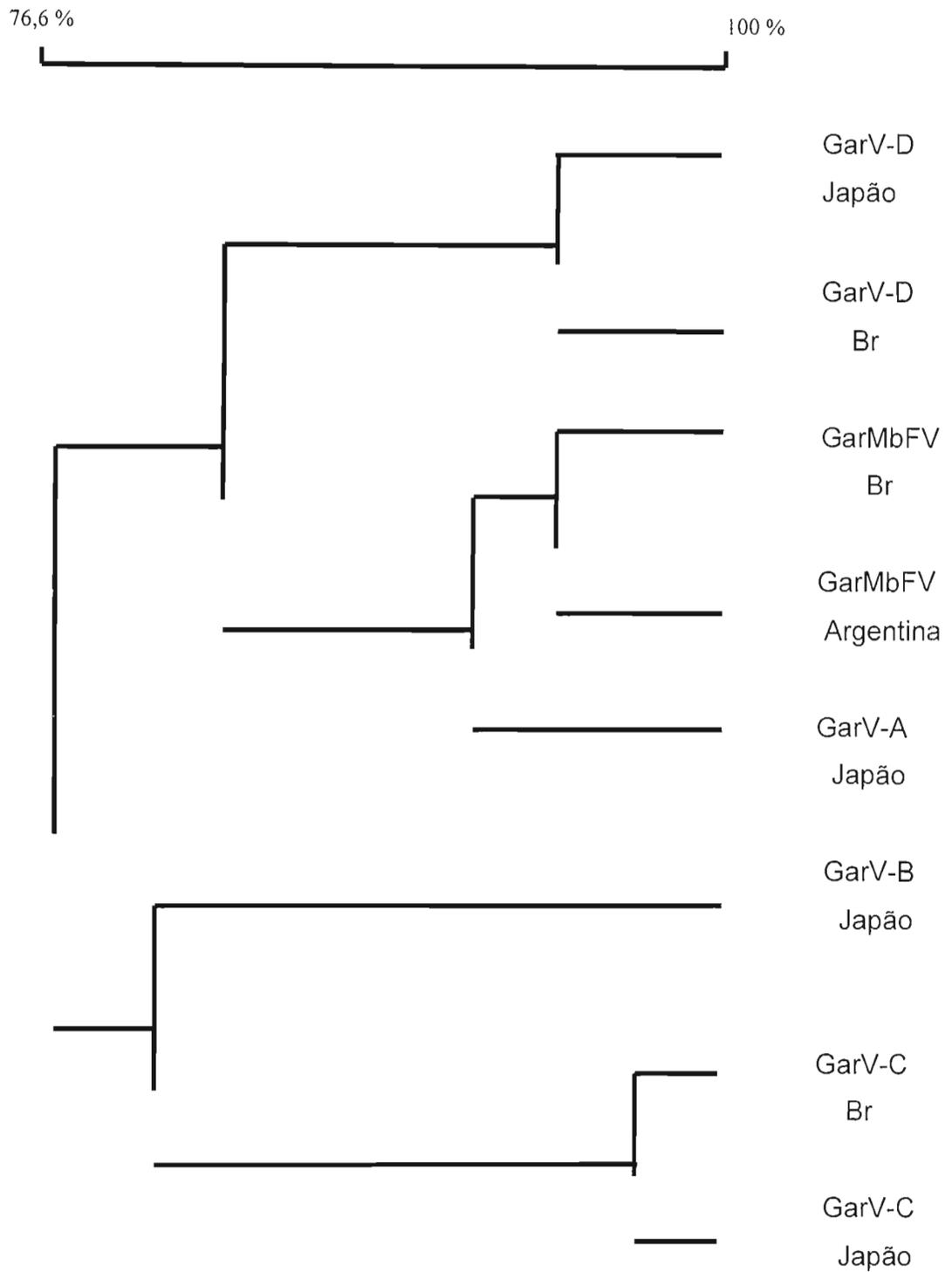


Figura 10. Árvore de identidade de aminoácidos da capa protéica de espécies de *Alexivirus* encontrados na Argentina, Brasil e Japão.

Espécie de <i>Allexivirus</i>	Seqüência de nucleotídeos	Posição
GarV-A japonêsatgaacaatcctgttgat	18
GarV-B japonês	atgggcgatcggaaccaaggaataa-t-ccaatcagg--c	1 a 40
GarV-C japonês---gtggagacagccta	18
GarV-D japonês-----tg-a-aa-gaa-c	18
GarMbFV argentino-----g-c-----c	18
GarMbFV brasileiro-----g-c--c-----c	18
GarV-C brasileiro---gtg-agacagccta	18
GarV-D brasileiro-----tg-a-aa-gaa--	30
GarV-A japonês	ccgagcacgtcacaacaaatgtccgggtactacgggtcaag	58
GarV-B japonês	t-a-cgct.....---g--caa--cga-gga-caagca	73
GarV-C japonês	t-tga-gatctcgtga-tgctg--atg--gacccgtc-a	58
GarV-D japonês	a-----c...---tc-ccacga-----agttaac-cgc	55
GarMbFV argentino	--a-----c--g-----a---t-c--aa----g-	58
GarMbFV brasileiro	--a-----c--g-----g-----a---c-c--aa----g-	58
GarV-C brasileiro	t-aga-ga-ct-gtgg-tgctgt-atg-acgacccgtc-a	58
GarV-D brasileiro	a-----t...---tc-ccacga-----ag-taac-cgc	67
GarV-A japonêsttagccagcctcgacc	74
GarV-B japonêsa-caga-t-aa--c--	89
GarV-C japonês	ctcagggattgaaccaggccacgtc-gc---ggatc-ag	98
GarV-D japonêsc-g-a-ca--c-ag--	71
GarMbFV argentino-----a-----	74
GarMbFV brasileiro-----a-----	74
GarV-C brasileiro	ctcagggactgagtcaggccacatc-gc---gg-tctag	51 a 59
GarV-D brasileiroc-g-a-ca--c-ag--	83
GarV-A japonês	caacgtgaacccttgggtcagagtcagaccgcccccta	114
GarV-B japonês	---ag--t--acc-cc--gaccc-tcg-tga-t-a...	126
GarV-C japonês	accg-gacttgta-cc--a-cag--tcacaaacg--tagc	138
GarV-D japonês	t-----atcag-t--c--c--ag---a--ta-g---tct	111
GarMbFV argentino	---t-----g--c--c---c---ct---t---t	114
GarMbFV brasileiro	---t--a-----g--c--c---c---act-----t	114
GarV-C brasileiro	accg-gacttgty-cc--a-cag--tc-caagcg--taac	138
GarV-D brasileiro	t-----tcag-t--c--c--ag---a--ta-gg--tct	123
GarV-A japonês	ggcaatcgtgatccgcaaaataatagt...aatgcaagny	115 a 151
GarV-B japonês	126
GarV-C japonês	aag---ccaga--atcctc--cgcaaggtggac-g-ct-	178
GarV-D japonês	---gc-----c---c---gc--accct-a-c-at.	150
GarMbFV argentino	----c-----t-----cagc-----g--ta	154
GarMbFV brasileiro	----c-----ta-----cagc---a-g--ta	154
GarV-C brasileiro	aag--c-c-aga--atcttc--cacaaggtggac-ggct-	178

GarV-D brasileiro ----g-----c--t-c----gc--accca-tca-c-ac. 123 a 162

GarV-A japonais acgactccgacgcactc...atgcccgcctgtgaccgact 187
GarV-B japonais ...-a-g-cca-a----tata-----tt---aa-at---- 163
GarV-C japonais t-acaaat--attgt-gccgag--agtctgagctggaggc 218
GarV-D japonais ..-acag--t-a---a...-----c--a-----a- 184
GarMbFV argentinno ----a-----t-a----...-----ag-t--a- 190
GarMbFV brasileiro ----a-----t-a----...-----ag-t--a- 190
GarV-C brasileiro t-acaaat--attgt-gccgag--aatctgagttggaggc 218
GarV-D brasileiro ..-acag----g--a...-----g-----a-ta--a- 196
GarV-A japonais ttgagactctcactaaagatgtcgaatccaactcagtcgc 227
GarV-B japonais -a-cag-ga-ag-a-gt--c--aact-----t-----a-- 203
GarV-C japonais ggt--cgaa-g--gtc-c--cgaattc-gt-gct-ca-. 256
GarV-D japonais -c--a-a--gg----c--c-----g--a-----c-a-- 224
GarMbFV argentinno -c--a--c--g--g--g-----t--t----- 230
GarMbFV brasileiro -c--a--c--a--g--g-----t--t----- 230
GarV-C brasileiro gg--cgaa-g-tgtc-c--cgaattc-gt-gct-cg-. 256
GarV-D brasileiro -c--a-a--gg----c--c--t--g--a-----a-a-- 236

GarV-A japonais ttcaaggttaattatttcgacataacttgacatgctacaa 267
GarV-B japonais ca--ca-gag-c---c--g--a--c--cag--cc--t--- 243
GarV-C japonais ...--agc-caat-cgca-atcctagac-ta.--t-gc 291
GarV-D japonais -----agcg-c---aa-a--t--c--g--t----- 264
GarMbFV argentinno -----aac-----a--a-----c--c----- 270
GarMbFV brasileiro -----aac--c-----a--a-----c--c----- 270
GarV-C brasileiro ...--agc-caat-cgca-atcctagac-t----t-gt 292
GarV-D brasileiro -----gcg-c---a--a--t--c--g-----g--- 276

GarV-A japonais gccaaagcgacaaggagccaccccaaaagaccttttctcac 307
GarV-B japonais --g-gcg-g-cc-ct--a--a--c-----t-g--t---- 283
GarV-C japonais --acgcaag-c-a-c--t--g-----c--t--c- 331
GarV-D japonais --a-cca-g-----t--a--g--g-----c--t--ct 304
GarMbFV argentinno -----a-----g-----g-----t--cc---c- 310
GarMbFV brasileiro -----a-----a-----g-----t--c-----c- 310
GarV-C brasileiro --acgtaag-c-aac--tt-g-----c--t--c- 332
GarV-D brasileiro --a-ccaag-c-----t--a--g--g-----c--t--tt 316

GarV-A japonais tagcttggacctgctaccacaacggttcatcgcgatttgt 347
GarV-B japonais -t--g---g-a-----t--a-----a-----cac 323
GarV-C japonais -t--a--g-t-----t-----c--ca-g-a-ac 371
GarV-D japonais -----g-----t--c--c--a--c--c-- 344
GarMbFV argentinno ---g-----t-----t--c-----a--c--c-- 350
GarMbFV brasileiro ---g-----t-----t--c-----a--c--c-- 350
GarV-C brasileiro -t--a--g-t-----t--t-----c--ca-g-acac 372
GarV-D brasileiro -----g-----c--c--a--c----- 356

AllexU-1 cccaagc-t--a---g-t-----*

GarV-A japonais taccctgaccactgacgcgccttgcggcatggcgactcg 387

GarV-B japonais	g--aa-----a-----t-----c-t-cag-a	363
GarV-C japonais	c-a---ag---g--t---g--t--a---t-t--tg-a	411
GarV-D japonais	---a--a-g---ga-a--a-----a---c-t-t---	384
GarMbFV argentin	----t-----a--c-----a-----a	390
GarMbFV brésilien	-----t--a--c-----a-----a	390
GarV-C brésilien	c-a---cg---g--t--a--g--t--a---t-t---g-c	412
GarV-D brésilien	---g--a-g---aa-a--a-----a---c-t-----a	396
GarV-A japonais	gaactcaaagacatcggtgaaaattcctgtacgctaagac	427
GarV-B japonais	--g-----c-----g--a---c---g---	403
GarV-C japonais	--g-----c-t---gg-a-tt--c--ct--c---	451
GarV-D japonais	-----t-g--c--g---t--c--at-g---	424
GarMbFV argentin	-----tg-t--c--gg-c-at--c--at---g-	430
GarMbFV brésilien	-----t--t--c--g--c-at--c--at---g-	430
GarV-C brésilien	--g-----c-t---gg-g-tt--c--tt--c---	452
GarV-D brésilien	-----t-g--c-----c-tt--c--at-g---	436
GarV-A japonais	agttttgcggtttttatgctaaagcctgtacgtcgcagg	467
GarV-B japonais	-a-----t---ac--c--c---a-a-----t---a-g--	443
GarV-C japonais	-a--c---g-----g---a-t--t-----aa-t--	491
GarV-D japonais	-a--c---g-----c-----t-----a-g--	464
GarMbFV argentin	-a--c--t--a--c-----c-----t-----a-.t-	469
GarMbFV brésilien	-a--c--t--a--c-----c-----t-----a-tt-	470
GarV-C brésilien	-a--c---g-----g---a-t--t-----ga-t--	492
GarV-D brésilien	-a--c---gg-----c-----t-----a-g--	476
GarV-A japonais	caaacaacaaaacaagccccctgcccaattggtctaggaaa	507
GarV-B japonais	g--g--g-----a--a-----c-----c-a---	483
GarV-C japonais	acg---g--g--t--atta--a--a-----g-a-----	531
GarV-D japonais	---g---g--g--a--a--a---g-----c--a---	504
GarMbFV argentin	gt--ac-gc---at--aa--g-ctg-c-a-t-gtcta-g--	509
GarMbFV brésilien	gt--ac-gc---at--aa--g.ctg-c-a-t-gtcta-g	471 a 509
GarV-C brésilien	acg---g--g-----a--a--a---a-----g-a-----	532
GarV-D brésilien	---g--g--g--g-----a--a---gc-----c-----	516
GarV-A japonais	ggttatcaggaagactcaaaattgcccgtttcgaacttct	547
GarV-B japonais	----tc--a--g--a-----t--t----	523
GarV-C japonais	--a-t-----t--g--g-----t-----t--t----	571
GarV-D japonais	--c--c--a--t---g-----ga--t-----	544
GarMbFV argentin	a-gcta-caag-aga-tcc--g--tg-tgc--tcgac-tc	549
GarMbFV brésilien	a-gcta-caag-aga-tcc--g--tg-tgc--tcgac-tc	549
GarV-C brésilien	--a-t-----t--g--g-----t-----t--t----	572
GarV-D brésilien	--g--c--a--c--tg-----gg--t-----	556
GarV-A japonais	ttaacgctgtactcagcgactcttctccgagtcctcccgg	587
GarV-B japonais	-c-----c---a-g-----g-----c-ca--a--t--	563
GarV-C japonais	-----a--gtcg-----ag-c--a-ac-----t--	611
GarV-D japonais	----t--g--g--t-----t---c--tgcc--a--t--	584
GarMbFV argentin	--t-atgccgtactgagtgactcctct-ctaa--c---t-	589
GarMbFV brésilien	--t-atgccg.actgagtgatc-t-t-ctaa.-c---t-	587

GarV-C brasileiro ----t--aa-gtc---t-----gg-c--a-ac--a--t-- 612
 GarV-D brasileiro ----t--g--g--t-----t---c--tgcc--a--t-- 596

GarV-A japonès aggtatgagattttaaacctacagacgccgaaatcctcgcg 627
 GarV-B japonès t-----c-----a--cc-t-ag--g--tg-g-ga 603
 GarV-C japonès c--c---c-c-----gc-a--a-----t--t-g- 651
 GarV-D japonès ---a-----c-----c--t-----t--t--t 624
 GarMbFV argentino ga-gcatgaga--c--a--ccacagatg-tg--attctcgc 629
 GarMbFV brasileiro ga-gcatgatg--c--a--ccacagatg-tg--attctcgc 627
 GarV-C brasileiro c--c---c-c--c-----c-a--g-----t--t-g- 652
 GarV-D brasileiro g--a-----c--t-----t--t--t 636

GarV-A japonès cattctatgaatgctaagatgtctattgttgaatctaggc 667
 GarV-B japonès --c--c-----c--a-----c--a-c--g--acc-a 643
 GarV-C japonès --c--cc----c--g--a-----a--ca-c--g--ac-ca 691
 GarV-D japonès --c--c-----c-----a-----g-----cc-c- 664
 GarMbFV argentino aca-tcca.tgaa-gcca-ga-g-ccat-gtggag-ccag 668
 GarMbFV brasileiro gca-tcc-ttgaa-gcca-ga-g-ccat-gtggag-ccag 667
 GarV-C brasileiro --c--cc-a--c--c--a-----a--ca-c-----ac-ca 692
 GarV-D brasileiro --c--c-----a-----g---c-c- 676

GarV-A japonès gcgccaccaacatggtctccactcgcgcggatttactcgc 707
 GarV-B japonès aa---t-g--t-----t-----a--c--c-cgt-g-- 683
 GarV-C japonès ag--t-----t-----a--a--t---g-ca-a-- 731
 GarV-D japonès -gt---g-----t--t--c-----t--cc-c--t-- 704
 GarMbFV argentino a--agc-acta--atgg-gtcaa-c---cggaccta-tt 708
 GarMbFV brasileiro a--agc-acta--atgg-gtcaa-c--t-cggaccta-tt 707
 GarV-C brasileiro ag-----t-----a--a--t--cg-ca-a-- 732
 GarV-D brasileiro -a---g-----t--t-----t--cc-t--t-- 716

GarV-A japonès acaacaacaatacatgagcagcctaaacctccaatgatc 747
 GarV-B japonès c-----g-----c-----agct--a-----c-tt---c-- 723
 GarV-C japonès g-----g--t--c--a-ct--c--g---tc---t-a 771
 GarV-D japonès -----g-----g----- 744
 GarMbFV argentino g--ca-ca-c-a-tccat-a-cagccg-aac-tcccatga 748
 GarMbFV brasileiro g--ca-ca-c-a-tccat-a-cagccg-aac-tcccatga 747
 GarV-C brasileiro g-----g--t--a-ct--c--g---tc---t-a 772
 GarV-D brasileiro -----g-----a--a--c--g--a----- 756

AllexU-2 ----cca| a| a-a----g--cgaacc **

GarV-A japonès acgttctaa 756
 GarV-B japonès --a---g- 732
 GarV-C japonès -----t-g- 780
 GarV-D japonès --a----- 753
 GarMbFV argentino ttacgt-ctgatga 762
 GarMbFV brasileiro ttacgt-ctgatga 761
 GarV-C brasileiro -----t-g- 781

Figura 11. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da capa protéica de espécies de *Allexivirus* seqüenciadas no Brasil e aquelas obtidas do GenBank, com os oligonucleotídeos AllexU-1 forward (1) e AllexU-2 reverso (2) sintetizados no Brasil. Os espaços tracejados na cor preta representam bases idênticas em todas as espécies e isolados comparados. Letras sublinhadas representam sítio de *Hind III*. * Seqüência do oligonucleotídeo AllexU-1. ** Seqüência do oligonucleotídeo AllexU-2. Alinhamento obtido pelo programa DNAMAN 4.0.

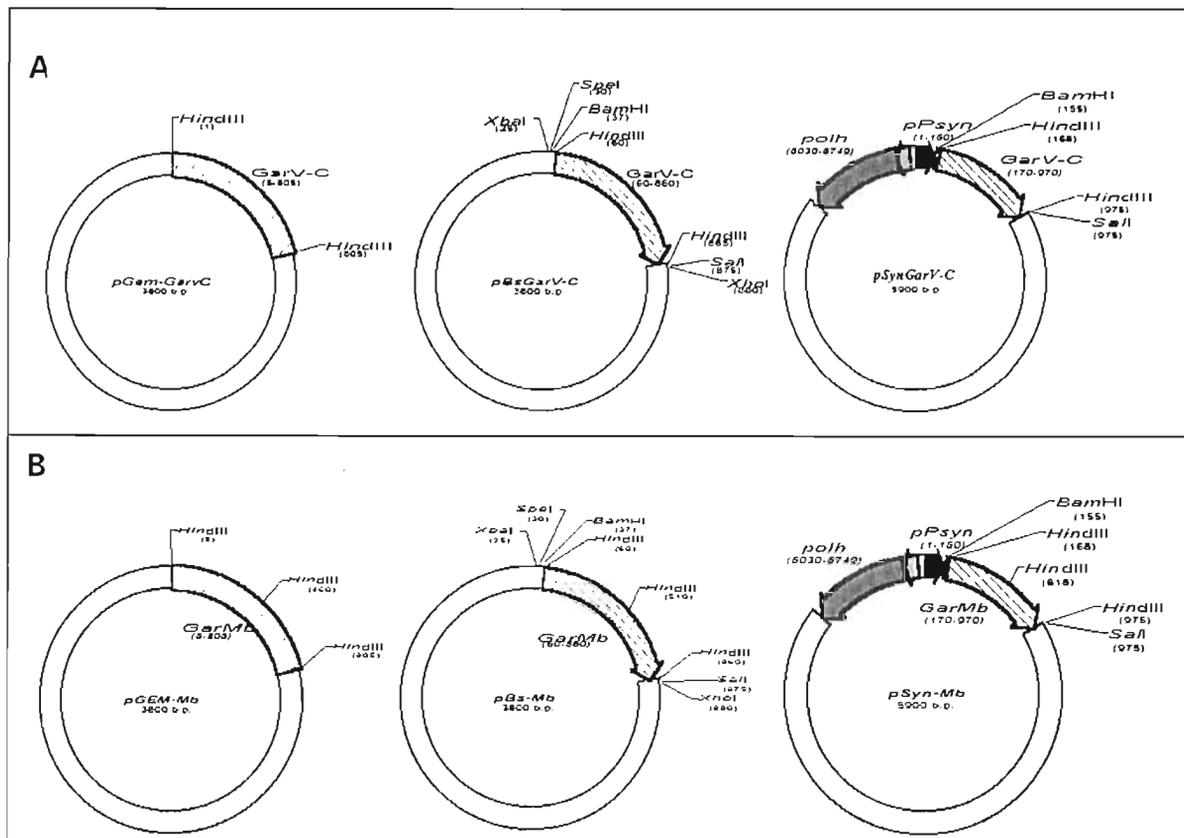


Figura 12. Seqüência da clonagem dos genes da capa protéica dos vírus GarV-C e GarMbFV. **A-** Gene da capa proteíca de GarV-C clonado nos plasmídeos pGEM-T, pBluescript SK (+/-) e pSynXIVV + X3, **B-** Gene da capa proteíca de GarMbFV clonado nos plasmídeos pGEM-T, pBluescript SK (+/-) e pSynXIVV + X3.

TABELA 2. Oligonucleotídeos utilizados nas reações da PCR de *Allexivirus* e tamanho esperado do fragmento amplificado

Oligonucleotídeos utilizados	DNA molde utilizado nas reações	Tamanho do fragmento esperado
ORF 603 e Pol R	vSynGalVI-	1.200 pb
ORF 603 e Pol R	vSynGarMb	2.000 pb
ORF 603 e Pol R	vSynGarV-C	2.000 pb

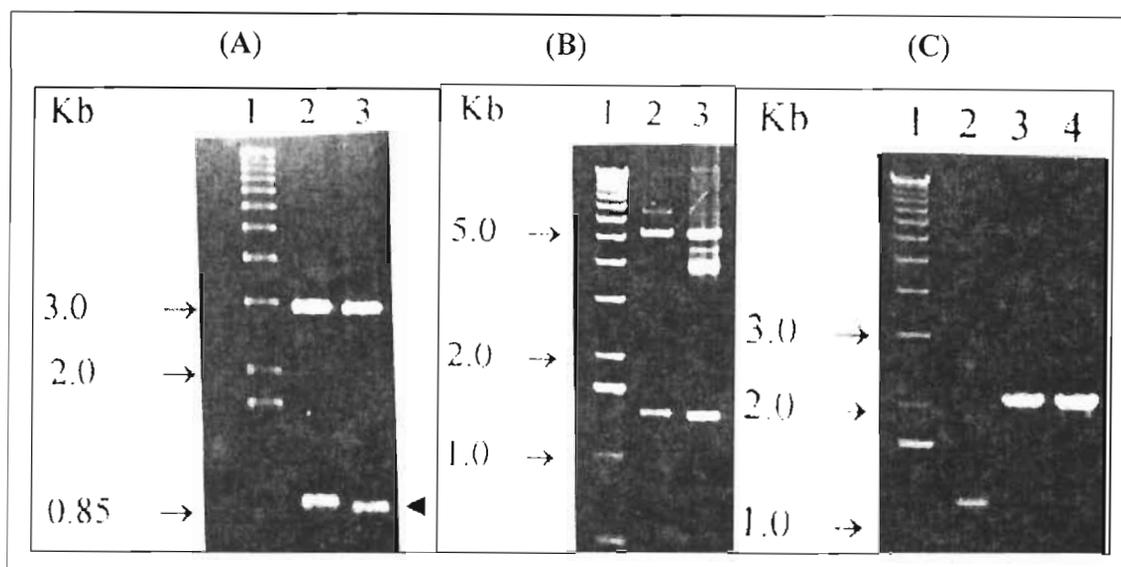


Figura 13. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 % dos genes capsidiais de GarMbFV e GarV-C **A** - Digeridos do plasmídeo pBluescript com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Sal* I. Marcador 1 kb plus DNA Ladder (1), pBsGarMb (2) e pBsGarV-C (3). **B** - Digeridos do plasmídeo pSynXIVVI+X3 com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Sal* I. Marcador 1 kb plus DNA Ladder (1), pSynGarMb (2) e pSynGarV-C (3) e **C** - Eletrofose em gel de agarose 1 % da PCR do DNA purificado do vírus vSynGalVI- e recombinantes vSynGarMb e vSynGarV-C utilizando os oligonucleotídeos ORF 603 e POL R. Marcador 1 kb plus DNA Ladder (1), vSynGalVI- com os primers ORF 603 e POL R (2), vSynGarMb com os primers ORF 603 e POL R (3) e vSynGarV-C com os primers ORF 603 e POL R (4).

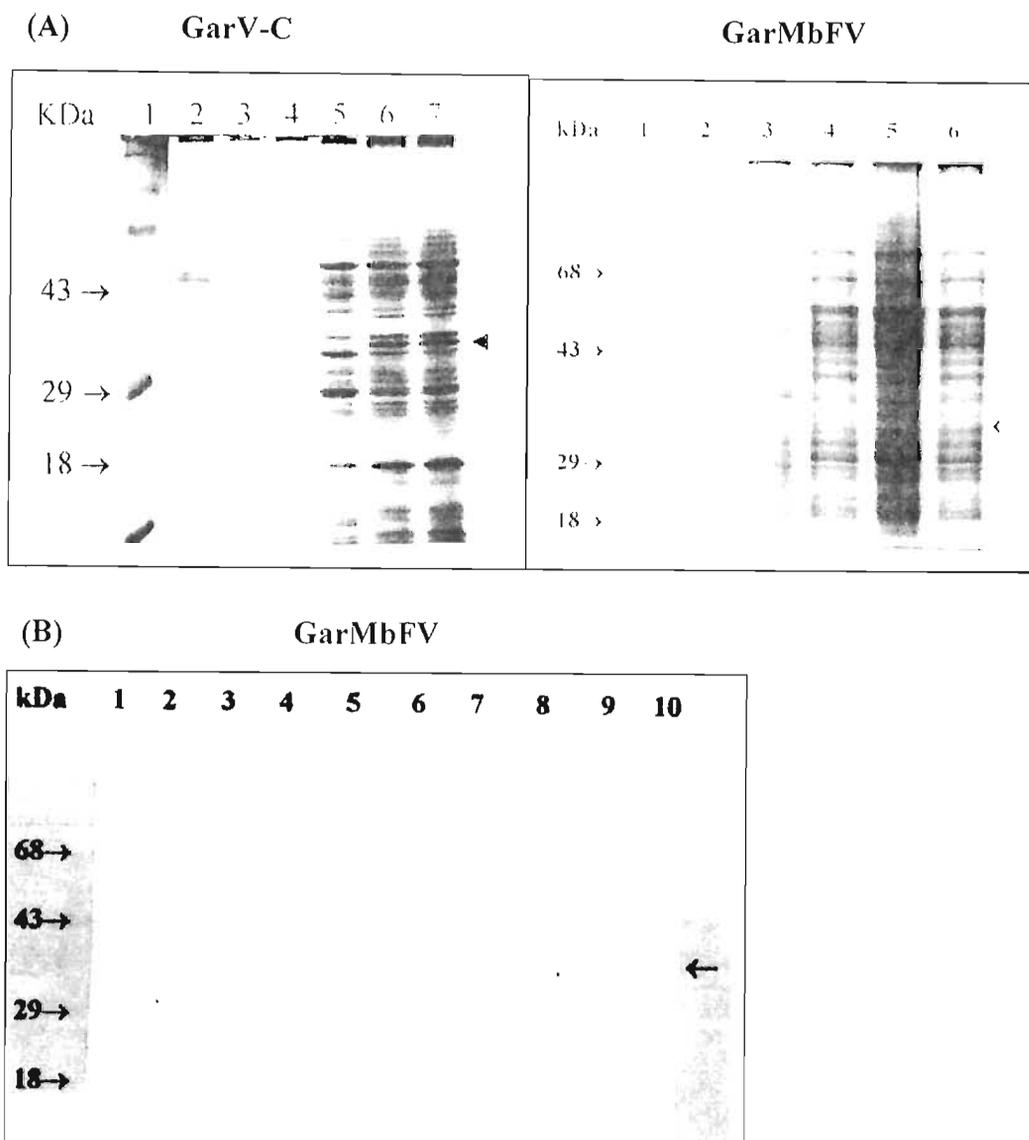


Figura 14 Análise da expressão das proteínas capsidiais de GarMbFV e GarV-C por SDS-PAGE. Em **A** – GarV-C e GarMbFV, com amostras coletadas 72 h.p.i. **1** – Marcador de massa molecular “high molecular weight”(Life Technologies). **2** – Extratos de células BTI-Tn5B1-4 não infectadas. **3** – Células infectadas pelo vírus AcMNPV 72 h.p.i. **4** – Células infectadas pelo vírus vSynGalVI- 72 h.p.i. Linhas **5, 6** e **7** – Extratos de células infectadas pelo vírus recombinante vSynGarV-C em diferentes concentrações. **1** – Marcador de massa molecular “high molecular weight”(Life Technologies). **2** – Extratos de células BTI-Tn5B1-4 não infectadas. **3** – Células infectadas pelo vírus vSynGalVI- 72 h.p.i. Linhas **4, 5** e **6** – Extratos de células infectadas pelo vírus recombinante vSynGarMb em diferentes concentrações. As setas indicam a presença

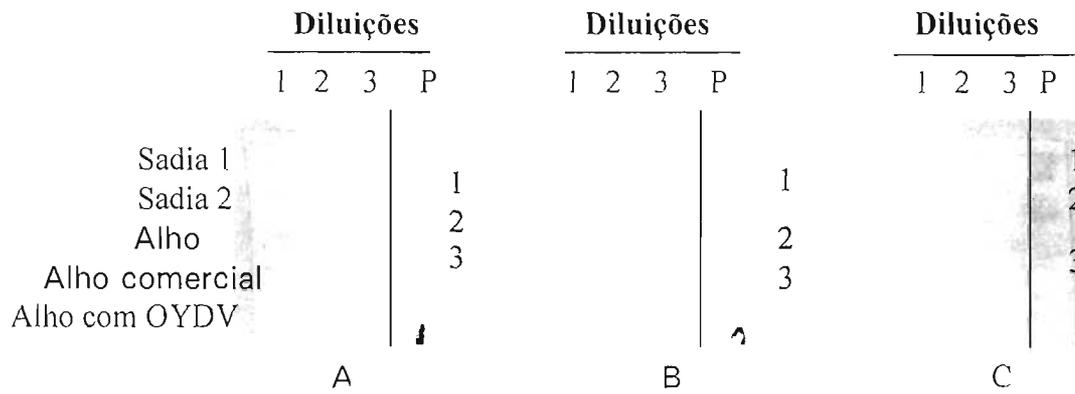


Figura 15. Análise do título do anti-soro bruto de GarV-C. A, B e C representam as diluições testadas de 1:2.500, 1:5.000 e 1:10.000. 1, 2 e 3, representam as diluições 1:10, 1:100 e 1:1.000, das amostras testadas. **P**, extrato de células purificado referente a proteína do GarV-C, nas mesmas diluições das amostras.

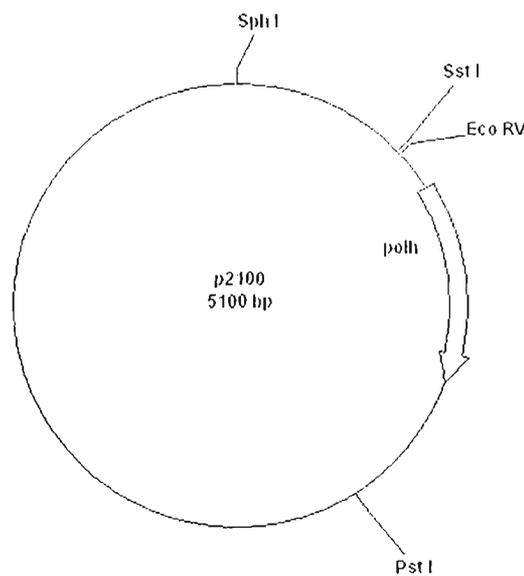


Fig 16: Vetor Baculovirus p2100 utilizado para aumentar expressão das proteínas de allexivirus.

de uma proteína de aproximadamente 32 kDa nos extratos de células infectados pelos vírus vSynGarV-C e vSynGarMb. Em **B**, Western blot de extratos de células infectadas com recombinante vSynGarMb. **1** – Marcador de massa molecular “high molecular weight”(Life Technologies). **2** – Extratos de células BTI-Tn5B1-4 não infectadas. **3** – Células infectadas pelo vírus AcMNPV 72 h.p.i. **4** – Células infectadas pelo vírus vSynGalVI- 72 h.p.i. Linhas **5, 7, 8, 9 e 10** – Extratos de células infectadas pelo vírus recombinante vSynGarMbFV em diferentes concentrações. **6** - Marcador de massa molecular “low molecular weight”(Life Technologies). As linhas **5, 7, 8, 9 e 10** de vSynGarMb. mostram a reação do anticorpo contra as proteínas capsidiais nos sobrenadantes de células infectadas pelo recombinante vSynGarMb. A seta indica marcações por volta da região de 32 kDa.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento - MAPA
Espelho de Relatório Final de Subprojeto

Identificação do Subprojeto

Ano de Elaboração do relatório: 2005

Código: 05.2002.001-03

Título: Estudo da Degenerescência por Virose na Cultura do Alho em Diversas Regiões do País

Unidade executora: Embrapa Hortaliças

Responsável: André Nepomuceno Dusi

Data efetiva de início: 01/01/2002

Data de término: 31/12/2004

Parceiros: Universidade de Brasília, Fazenda Campininha (Buritis, MG)

Projeto ao qual está vinculado

Título: Desenvolvimento de Tecnologia de Produção de Alho-Semente Livre de Vírus - Fase III

Líder: André Nepomuceno Dusi

Resumo

No ano de 2002, foi implantado um ensaio no município de Buritis, MG, para avaliação da degenerescência causada por vírus. Foi o terceiro ano do ensaio, que vinha sendo conduzido desde 2000, dentro do projeto 05.1999.025, encerrado em 2001. Este ensaio foi repetido em 2003, acrescentando-se assim mais um ano de exposição em campo. Foi conduzido também, no campo experimental da Embrapa Hortaliças, a sétima exposição de um ensaio iniciado em 1996, conduzido pelo estudante do curso de doutorado em fitopatologia da Universidade de Brasília, como parte de seu trabalho de tese, defendida em abril de 2003. Esse ensaio encerrou-se em 2002, pois com sete exposições foi possível obter um modelo que identificou o potencial de produção em até 11 exposições.

Foi montado o segundo ano do ensaio para avaliação do efeito de distância da fonte de inóculo e direção na disseminação de vírus em alho. O resultado de 2002 foi semelhante ao de 2001, quando se observou que as maiores porcentagens de infecção

concentram-se num raio máximo de 3 m da borda da fonte de inóculo. Não foi observado efeito de direção na disseminação.

Nos ensaios de degenerescência, além de características como produção e número de bulbos por parcela, foi avaliada também a porcentagem de infecção por vírus, utilizando-se um anti-soro polivalente, um anti-soro policlonal contra OYDV e um anti-soro produzido contra proteína da capa protéica de LYSV expressa em *E. coli*. Pode-se concluir que a infecção por OYDV, em geral, se estabelece antes de LYSV. No ensaio de degenerescência também foi observada uma maior incidência do OYDV sobre o LYSV. Os resultados preliminares do ensaio na Embrapa Hortaliças indicam a possibilidade de uso de uma mesma semente por no mínimo 7 anos. Em Buritis, os resultados indicam que, quando em condições de campo que não uma estação experimental, a possibilidade de uso da mesma semente pode ser estendida por mais de 15 anos. Em razão da repetição do padrão nos ensaios conduzidos na Embrapa Hortaliças e em Buritis, decidiu-se pelo encerramento e análise final do ensaio.

Resultados Finais

Em continuidade as trabalhos iniciados desde 1996 com os primeiros estudos de degenerescência em alho na Embrapa Hortaliças, uma série de experimentos conduzidos até o fim de 2002 permitiu a avaliação da degenerescência após sete exposições consecutivas em campo.

Para avaliação da degenerescência em plantas de alho com infecção por vírus, foram conduzidos seis experimentos em condições de campo, utilizando-se a cultivar Amarante. Dois experimentos foram conduzidos junto a um produtor em Água Fria - GO (1999 e 2000) (Agropecuária Alhos Centro-Oeste, Fazenda Novo Horizonte) e quatro no campo experimental da Embrapa Hortaliças no Gama - DF (1999 a 2002). O delineamento experimental adotado foi de blocos ao acaso com $n + 2$ tratamentos e seis repetições, onde n foi o número de gerações em que o alho foi exposto ao complexo viral no ano anterior e os outros dois tratamentos foram o alho originalmente livre de vírus (T1) e o material utilizado pelos agricultores (T8). O alho livre de vírus, produzido na Embrapa Hortaliças, foi obtido por cultura de ápices caulinares e termoterapia e indexados por Isem, sendo em seguida multiplicado em telados à prova de afídeos. A cada ano mais um tratamento foi acrescentado aos experimentos, constituindo-se da geração subsequente de exposição do material em campo (T2 a T7)

(Tabela 1). As parcelas foram constituídas de um camalhão de 2,0 x 1,0 m, contendo 60 bulbilhos.

Algumas características foram avaliadas durante a condução dos experimentos com objetivo de detectar possíveis danos causados pela infecção com vírus.

O número de folhas foi avaliado em 15 plantas por parcela contando-se todas as folhas da planta a partir da sua base. Essa característica deixou de ser avaliada em todos os experimentos conduzidos a partir de 2000. Isso por não ter se configurado como um caráter seletivo. A altura das plantas, medida da base até o ápice da folha apical, também foi avaliada em 15 plantas por parcela. A partir de 2000, essa característica foi avaliada somente aos 90 dias após o plantio (dap). Isso porque os resultados foram semelhantes tanto aos 60 dap quanto aos 90 dap. Também porque aos 90 dap as plantas já estão mais próximas de atingir o seu crescimento vegetativo máximo e isso, permite melhor observação dos danos provocados pela atuação dos vírus. Tanto para número de folhas, quanto para altura de plantas, a média de todas as plantas de cada parcela constituiu o resultado de cada repetição.

O peso total de bulbos foi obtido após a cura trinta dias à sombra sobre estrado de madeira e em galpão ventilado.

A classificação comercial de bulbos foi procedida em classificador mecânico na Embrapa Hortaliças, baseada no diâmetro mediano dos bulbos produzidos conforme pode ser visto na Tabela 3 e Figura 1.

A infecção das plantas durante os experimentos foi avaliada tomando-se 15 bulbos por parcela, coletadas ao acaso ao final do ciclo do último ensaio em 2002. Um bulbilho de cada bulbo foi semeado em bandejas de plástico em casa de vegetação. Trinta dias após o plantio, foram amostradas 5 plantas por parcela coletando-se a folha apical de cada uma delas para realização de teste sorológico via Dot-Elisa. As amostras foram trituradas em ½ PBS e aplicadas em membranas de nitrocelulose nas diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000. Os anti-soros empregados foram: um policlonal polivalente, um policlonal específico para OYDV e outro para LYSV produzido por expressão de proteínas em bactéria.

A presença de afídeos foi monitorada a partir da coleta de exemplares através do emprego de armadilha de bandeja de água, medindo 30 cm X 20 cm X 4,5 cm e pintada na cor amarela na parte interna e marrom pelo lado de fora. A armadilha foi colocada em frente ao experimento, sob suporte de tijolo de 6 furos com uma altura de 7 cm e sem acompanhar a variação em altura decorrente do desenvolvimento da cultura (Figura 2).

As coletas foram procedidas a intervalos de três dias onde os espécimes foram colocados em recipientes de vidro com tampa contendo álcool 70 % sendo em seguida classificados em gênero com auxílio de microscópio estereoscópico. O referido monitoramento foi executado apenas nos anos de 1999 e 2000 e tanto em Água Fria quanto no Gama, para fins da comprovação da presença de vetores ativos no campo durante a execução dos experimentos.

O número de folhas avaliado em cada local no ano de 1999 foi submetido a uma análise de variância segundo o delineamento de blocos ao acaso em parcelas divididas, tomando os tratamentos como efeito principal aplicado às parcelas e as duas épocas de avaliação aplicado às subparcelas. O objetivo dessa análise foi verificar o valor dessa característica para avaliação do comprometimento causado pela infecção sobre o crescimento das plantas de alho. A análise foi feita usando o procedimento GLM (SAS 1999). A altura de plantas também foi avaliada para cada local de coleta em 1999. O modelo de análise foi o mesmo descrito para número de folhas. Nessa análise, a qual foi procedida especificamente para os experimentos de 1999, buscou-se averiguar a necessidade de se proceder a essa avaliação aos 60 dap e 90 dap nos demais experimentos que seriam conduzidos a partir de 2000.

A análise estatística conjunta para produtividade, peso médio de bulbos e altura de plantas aos 90 dap, considerou os dados dos seis experimentos. Para essa análise foi utilizado um modelo que considerou os efeitos de ambiente, bloco dentro de ambiente, tratamento e a interação tratamento vs. ambiente. Cada combinação de efeito de local e ano foi tomada como um ambiente. O efeito de tratamento foi considerado fixo e os demais aleatórios. A decomposição do efeito de tratamento foi realizada comparando-se cada tratamento com o T8 utilizando-se o teste unilateral de Dunnett a 1 %. A análise de variância e as comparações entre tratamentos foram feitas usando o procedimento Mixed (SAS 1999). Este procedimento foi escolhido porque ele incorpora em seu processo de estimação a aleatoriedade da interação tratamento vs. ambiente. Com isso, as estimativas das médias ajustadas de tratamento puderam ser obtidas mesmo sem a presença dos oito tratamentos em todos os ambientes.

A análise de variância para número de folhas em cada local encontra-se na Tabela 4. Não foi verificada diferença estatística significativa entre tratamentos conduzidos no Gama, nem na interação Tratamento vs. Época nos dois locais.

A comparação entre as médias dos tratamentos relativa ao número de folhas é apresentada na Tabela 5.

Na Tabela 5 é possível observar que em Água Fria, o T1 e o T3 não diferiram do T8. No Gama, não houve diferença estatística significativa entre todos os tratamentos.

Os resultados da análise de variância para altura de plantas podem ser vistos na Tabela 6. Nessa tabela percebe-se que houve semelhança tanto em Água Fria quanto no Gama. Em ambos locais detectou-se efeito significativo para tratamento e época de avaliação e não significativo para a interação entre esses fatores. Assim os resultados desses experimentos podem ser interpretados em termos das diferenças entre as épocas de avaliação e o valor médio dos tratamentos.

As médias desses experimentos para cada tratamento analisados são apresentadas na Tabela 7. Nessa tabela é possível observar que nos dois locais, todos os tratamentos diferiram do T8.

Em todos os experimentos, foi verificado que o diâmetro do pseudocaule das plantas de T1 mostrou-se aparentemente superior ao T8. Entretanto, esta foi apenas uma observação não quantificada (Figura 3).

A estimativa dos componentes de variância dos fatores aleatórios considerados no modelo (Proc Mixed, SAS 1999), bem como, os testes para o efeito fixo de tratamento em relação à infecção viral, são apresentados na Tabela 8. Nesse caso, foram considerados os descritores agrônômicos: produtividade, peso médio de bulbos e altura de plantas aos 90 dap. Nessa mesma tabela percebe-se que para todos os três descritores agrônômicos houve efeito da infecção viral.

Do T1 para T2 houve uma redução em altura de plantas de 2,6 cm (4,9 %) e uma queda de produtividade de 17,9 %. De T1 para T3, a redução em altura de plantas foi de 4,2 cm (8,1 %) e de 28,2 % em produtividade (Tabela 10). A análise de correlação entre altura e produtividade foi significativa ($P=0,000387$) com coeficiente de correlação $r=0,946$. As Figuras 5.4 e 5.5 mostram o comportamento da produtividade em função da altura das plantas e das exposições ao complexo viral (dados de seis experimentos conduzidos em Água Fria/GO e no Gama/DF).

A Figura 5 mostra que a partir de T6, a produtividade da cultura tende a se estabilizar com uma produtividade cerca de 30% superior.

Para peso médio de bulbos totais, a maior redução ocorreu do T2 para T3 (2,30 g), o que corresponde a uma redução de mais de 13 % do peso obtido com o T1. Do T1 para T4, T5 e T6, as reduções foram de 24 %, 27 % e 28 % (4,08 g, 4,62 g e 4,82 g), respectivamente (dados obtidos com a análise conjunta de seis experimentos conduzidos em Água Fria/GO e no Gama/DF).

De T1 a T4 a classificação comercial de bulbos apresentou uma porcentagem de bulbos enquadrados nas classes de 4 a 7 superior a 50 % (71,65 %, 60,10 %, 58,75 % e 52,59 %, respectivamente) (dados obtidos com a análise conjunta de seis experimentos conduzidos em Água Fria/GO e no Gama/DF) (Figura 5.6).

A Tabela 11 apresenta o percentual de bulbos classificados nas classes de 4 a 7 por ciclo de exposição. Nela é possível observar que até T2, os bulbos permaneceram quase que eqüitativamente distribuídos entre as classes 4, 5, 6 e 7. Também pode ser observado que para T8, do total de bulbos classificados nas classes de 4 a 7 (34,69 %), 54 % se enquadraram na classe 4 e 32,0 % na classe 5.

Com o objetivo de constatar a presença de insetos vetores associados aos experimentos foram efetuadas coletas de afídeos tanto em Água Fria quanto no Gama durante os anos de 1999 e 2000. De todos os gêneros coletados, *Lipaphis* sp., *Aphis* spp, *Rhopalosiphum* sp., *Hyperomyzus* sp. e *Geopenphigus* sp, foram os mais freqüentes. Em todos os anos, foi constatada a presença de *Myzus persicae* e *Neotoxoptera formosana*, ambas comprovadamente vetoras de vírus de alho.

A flutuação populacional de afídeos observada durante todo o período (abril a outubro, 1999 e 2000) pode ser vista na Figura 7. Na figura é possível observar a existência de um pico populacional no Gama em 2000.

A avaliação da infecção viral, efetuada por Dot-Elisa, revelou que aproximadamente 27 % das plantas do T1 já se encontravam infectadas logo ao final do primeiro ciclo de exposição aos vírus (Tabela 12). A partir de T2, esse valor aumentou para, pelo menos, 60 %.

Também na Tabela 12 pode ser visto que OYDV mostrou maior rapidez em infectar as plantas de alho livre de vírus que LYSV.

A Figura 8 mostra que com o aumento do número de plantas infectadas, ocorre um decréscimo em produtividade. Foi observada uma correlação negativa significativa ($P=0,00459$) com coeficiente de correlação $r=-0,874$).

Apesar do elevado número de plantas infectadas logo ao fim da segunda exposição, o título parece só se tornar alto ao fim da quinta exposição (Figura 9). Uma avaliação subjetiva das membranas de sorologia evidenciou que com o aumento do número de ciclos que o material se multiplica no campo, ocorre um aumento do título de vírus na planta. Isto pode ser notado pela maior intensidade da reação.

A altura de plantas mostrou ser uma característica adequada para estudo de degenerescência provocada por vírus em plantas de alho. No trabalho ora apresentado e considerando a análise conjunta dos seis experimentos, a variação para altura de

plantas entre T4 e T8 foi de 5,9 cm aos 90 dap, o que corresponde a 11 % do tamanho total das plantas (Tabela 9). Em função desse resultado, um ensaio para avaliar-se o efeito de infecção por vírus na área foliar das plantas de alho será delineado para ser conduzido por um estudante de mestrado da Universidade de Brasília nos anos de 2004 e 2005.

Quanto ao percentual de infecção das plantas, onde se observou que logo ao final da primeira e segunda exposições mais de 26 % e 83 % das plantas já se encontravam infectadas, respectivamente (Tabela 12), verificou-se que mesmo assim a produtividade da cultura não apresentou grande redução (Tabela 9). Paralelamente, observando-se as Figuras 4 e 8, que apresentam a evolução da redução em produtividade em função do decréscimo na altura de plantas e do aumento no percentual de plantas infectadas, percebe-se que o decréscimo da produção pode ser explicado por um modelo logarítmico, onde com o máximo de altura ou mínimo de porcentagem de infecção ao fim do ciclo, a cultura expressa o seu máximo potencial produtivo, considerando as condições de cultivo dos experimentos.

Na análise estatística efetuada empregando-se o procedimento Mixed, os melhores resultados para altura de plantas foram obtidos até T5 (Tabela 9). T6 e T7 não diferiram estatisticamente do T8. Ainda nessa tabela e para esta mesma característica e exposições, vê-se que o ganho em produtividade foi ainda acima de 30 %. Esse percentual indica que a produção de alho comercial a partir do uso de alho-semente originalmente livre de vírus, pode ser agronomicamente viável por um número maior de gerações que apenas cinco.

Para peso médio de bulbos, houve diferença significativa do T1 ao T4 em relação ao T8 (Tabela 9). O mesmo não foi verificado de T5 em diante. Empregando-se o mesmo raciocínio utilizado para altura de plantas, o ganho em produtividade obtido com T7 (31,44 %) e o aumento do percentual de bulbos das classes de 4 a 7, podem ser suficientes para permitir que o cultivo a partir de alho originalmente livre de vírus possa se estender até a sétima exposição. Considerando-se uma estimativa pelo modelo logarítmico ajustado (figura 5), estima-se que até a 11^a exposição, ter-se-á uma produtividade ainda superior ao T8, quando então a produtividade deverá se estabilizar.

Observando-se a evolução da infecção das plantas (Tabela 12), nota-se que até o T3, nem todas as plantas tornaram-se infectadas. Isso só ocorreu a partir de T4 que, ao final do ciclo, produziu ainda material de plantio com capacidade de ganho em produtividade em relação ao T8 superior a 39 %. O aumento do número de plantas infectadas refletiu-se na redução na altura média de plantas e na produtividade.

Entretanto, a produtividade estabilizou-se em aproximadamente 30 % acima do T3 a partir de T6 (Tabela 9). O que pode ter acontecido devido ao complexo viral ter atingido sua composição máxima (complexidade de espécies virais) nessa geração e com isso, ter produzido maior efeito sobre as plantas de sexta geração em diante (Figura 9). Nessa mesma figura percebe-se que o título dos vírus presentes nas plantas passa a ser maior a partir de T5. Isso dado ao maior número de plantas que apresentaram resultados positivos com as amostras mais diluídas.

A maior incidência de vetores após o terceiro mês de vida das plantas observada nos experimentos aqui conduzidos (Figura 7), sugere que a coleta de material aos 90 dap para avaliação da infecção viral pode estar subestimando o dado. Isso porque, com mais de um mês de vida que ainda resta para as plantas, podem ocorrer novas infecções. Com as avaliações aos 90 dap, essas deixariam de se computadas. Portanto, foi decidido que a avaliação da infecção viral a partir de 2000, seria procedida no final do ciclo das plantas.

Nos experimentos ora conduzidos (de T4 a T7), 26,7 % das plantas já se encontravam infectadas logo ao final da primeira exposição e o ganho médio em produtividade para os seis experimentos conduzidos nos dois locais foi superior a 100 % na primeira exposição (Tabela 9).

Ainda observando a Tabela 9, vê-se que até T6 houve diferença significativa para produtividade entre as exposições e o T8. Esse resultado poderia sugerir que a partir de T6 não mais seria viável a produção de alho comercial a partir de alho-semente originalmente livre de vírus. Entretanto, em ambientes com menor pressão de inóculo que as aqui experimentadas, o processo de degenerescência nas plantas de alho pode vir a ser mais lento. Isso pode possibilitar um aumento no número de exposições bastante superior aos agora discutidos.

Com base nos estudos desenvolvidos, propôs-se um sistema de multiplicação de bulbilhos-semente de alta qualidade sanitária. O mesmo é fundamentado na multiplicação inicial sob telado a prova de afídeos, de bulbilhos livres de vírus, com posteriores multiplicações sucessivas a campo. O referido sistema está sendo validado para a cv. Amarante junto a produtores da Bahia, Goiás e Minas Gerais. As ações são executadas no âmbito do subprojeto 05.2002.001-04. Nesse sistema, o primeiro ano de multiplicação é feito em telado de 18 m² composto por estrutura metálica em ferro galvanizado e tela antiafídeo. O custo estimado desse telado é de R\$ 500,00 (informações obtidas na Embrapa Hortaliças). Nesse primeiro ano são semeados 1.800 bulbilhos e a produção estimada é de 12.600 bulbilhos (proporção de 1:7). No segundo

ano, 1.800 bulbilhos retornam ao telado e 9.000 bulbilhos são semeados a campo produzindo ao final do ciclo cerca de 63.000 bulbilhos. No terceiro ano, repetem-se os plantios de telado, de primeira exposição em campo e semeia-se também em campo os 63.000 bulbilhos ora obtidos. Estes produzirão cerca de 441.000 bulbilhos, o suficientes para o plantio de um hectare. Do quarto ano em diante, todas as etapas do processo são repetidas, gerando assim um fluxo de sementes de alta qualidade. A Tabela 13 apresenta um resumo do esquema de multiplicação desse sistema e a produtividade esperada à luz dos resultados obtidos com o presente trabalho (trecho hachurado).

Com base nos resultados obtidos com a presente pesquisa é possível concluir que o sistema pode se estender até a sétima geração consecutiva de cultivo a campo. Nesse caso, o produtor poderia comercializar ao final do quinto ano, 47,5 t de bulbos como material de plantio capaz de levar a produtividade da cultura em aproximadamente 39,15 % ou ao final do sexto ano, 306,8 t de bulbos comerciais (Tabela 13).

Além das informações aqui geradas, julga-se ser necessário agora a realização de pesquisas que visem avaliar os efeitos isolados e sinérgicos das principais espécies de vírus que infectam o alho (OYDV, LYDV, GarCLV, GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarMbFV).

O ensaio de degenerescência implantado em Buritis (MG) no ano de 2002 teve quatro tratamentos da cultivar Amaranthe descritos abaixo:

T1 - Plantas livre de vírus

T2 - Plantas com uma exposição (2001)

T3 - Plantas com duas exposições (2000 e 2001)

T4 - Controle com plantas infectadas normalmente utilizadas pelo produtor

A produtividade verificada no ensaio é apresentada na tabela 14.

A qualidade fisiológica e sanitária da semente implicou num melhor estabelecimento do estande. Todas as parcelas foram plantadas com 200 bulbilhos. Entretanto, conforme se observa na tabela 15, o tratamento T3 e T4 apresentaram uma maior redução do estande.

Entretanto, vale ressaltar que o ensaio de 2001, que gerou as sementes utilizadas nos tratamentos T3 e T4, apresentou um problema de natureza não determinada que resultou num grande número de bulbos chochos. Portanto, os resultados das análises aqui apresentadas devem ser interpretados com cautela. Para

o ano de 2003, o ensaio será repetido, acrescentando-se mais um tratamento livre de vírus (T1) e os atuais T1 a T4 passarão a ser os tratamentos T2 a T5. A análise final do experimento será realizada conforme descrito para os ensaios conduzidos em Água Fria e Gama, quando o tratamento da mais longa exposição de plantas originalmente livres de vírus apresentar produtividade igual ao controle infectado.

A melhor qualidade da semente também implicou em um maior número de bulbos nas classes de maior valor comercial (classes 5 ou superiores), conforme se observa na tabela 16.

Ao fim do experimento, uma amostra de 7 a 10 plantas por parcela (tratamentos T2 a T4) ou de 15 a 20 plantas por parcela (T1) foi testada por Dot-Elisa para determinação da porcentagem de infecção com OYDV e LYSV e vírus total. Foram utilizados anti-soros policlonais específicos para os vírus OYDV, LYSV, e anti-soro polivalente para o complexo viral do alho (tabela 17).

O ensaio de degenerescência implantado em Buritis (MG) no ano de 2003 teve cinco tratamentos da cultivar Amaranthe descritos abaixo:

T1 - Plantas livre de vírus

T2 - Plantas com uma exposição (2002)

T3 - Plantas com duas exposições (2001 e 2002)

T4 - Plantas com três exposições (2000, 2001 e 2002)

T5 - Controle com plantas infectadas normalmente utilizadas pelo produtor

A produtividade verificada no ensaio é apresentada na tabela 18. Um modelo exponencial em uma avaliação preliminar da degenerescência considerando o ano de 2004 apenas indicou que a mesma semente poderia ser utilizada por mais de 15 anos (figura 10) o que corrobora a tese de que quando a pressão de inóculo é menor (como no caso de um campo de produção comparado com uma estação experimental) o potencial de uso da semente é mais longo. As parcelas foram amostradas para análise do percentual de infecção, apresentada na figura 11.

Foi implantando um ensaio para determinação da distância e direção de disseminação de vírus no alho. Foi o segundo ano em que o mesmo ensaio foi repetido. O delineamento é ilustrado na figura 12.

O ensaio foi implantado em uma área 1000 m distante de áreas de produção de aliáceas. 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 diâmetro (aproximadamente 20 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 estão sendo atualmente indexado por Dot-Elisa utilizando-se anti-soros policlonais específicos para os vírus OYDV, LYSV, e anti-soro polivalente para o complexo viral do alho.

Nos ensaios de 2001, cobertos no relatório final do projeto 05.1999.025, não foi observado efeito de direção. As plantas infectadas, em baixo número, se distribuíram aleatoriamente nas amostras. Foram testadas 10 plantas por parcela no raio 1 e de 15 a 20 plantas por parcela nos raios 2 a 5. Os índices de infecção observados para cada raio são apresentados na tabela 19.

Em uma primeira avaliação, novas infecções circunscrevem-se em torno da fonte de inóculo. Uma única planta infectada foi detectada no raio 5. O resultado, até o momento, está de acordo com estudos epidemiológicos de outros potyvirus em diferentes culturas. As parcelas referentes ao ensaio de 2002 estão sendo avaliadas atualmente e serão reportadas no relatório do próximo ano. O resultado dos dois anos de ensaio será discutido em conjunto.

Publicações

Considerando que as atividades desse subprojeto se dão em continuidade ao projeto 05.1999.025, as publicações geradas no ano de 2002 listadas abaixo foram obtidas com os dados de 2001 que não haviam sido relatadas. Este relatório é cumulativo e acrescentamos aqui as publicações referentes a 2003.

MELO FILHO, P. A.; DUSI, A. N.; TORRES, A. C.; RESENDE, R. O. Gradiente de Reinfecção por Vírus em Plantas de Alho Após Seis Exposições a Campo ao Complexo Viral Comumente Associado à Cultura In. 7 SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA

DE SEMENTES, 2002, Sete Lagoas 7 Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes Resumos e Palestras, Sete Lagoas, MG. Embrapa Milho e Sorgo, 2002, p. 58.

MELO FILHO, P. A.; DUSI, A. N.; AVILA, A. C.; BUSO, J. A.; TORRES, A. C.; RESENDE, R. O. Degenerescence of garlic plants by virus infection after six sequential filed exposures In. XXXV CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2002, Recife. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, n. SUPLEMENTO, p. s209-s209.

MELO FILHO, P. A.; DUSI, A. N.; BUSO, J. A.; TORRES, A. C.; AVILA, A. C.; RESENDE, R. O. Degenerescence of garlic plants caused by virus infection after five sequential field generations In. CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 2002, *Summa Phytopathologica*, 2002, v. 28, n. 1, p. 107-108.

MELO FILHO, P. A.; DUSI, A. N.; COSTA, C. L.; RESENDE, R. O. Colonização de plantas de alho por *Neotoxoptera formosana* (Hemiptera: Aphidoidea) no Brasil. In: 43O CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 2003, Recife. *Horticultura Brasileira*. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Olericultura, 2003. v. 21, p. 413-413.

MELO FILHO, P. A.; DUSI, A. N.; BUSO, J. A.; TORRES, A. C.; RESENDE, R. O. Degenerescence of seed garlic after seven field exposures to natural virus infection. In: XIV NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 2003, Florianópolis. *Virus Reviews & Research*. Rio de Janeiro, RJ: Sociedade Brasileira de Virologia, 2003. v. 8, p. 184-185.

MELO FILHO, P. A.; DUSI, A. N.; BUSO, J. A.; TORRES, A. C.; RESENDE, R. O. Diversity of Allexivirus naturally infecting garlic fields in Brazil. In: XIV NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 2003, Florianópolis. *Virus Reviews & Research*. Rio de Janeiro, RJ: Sociedade Brasileira de Virologia, 2003. v. 8, p. 191-191.

DUSI, A. N.; ORÍLIO, A. F.; TORRES, A. C.; BUSO, J. A.. Inoculum source distance and the spread of viruses in garlic. In: XXXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2003, Uberlândia, MG. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2003. v. 28, p. s301-s302.

MELO FILHO, P. A. Detecção e caracterização molecular de Allexivirus e estudo da degenerescência em plantas de alho provocadas por vírus. 2003. 134 f. Universidade de Brasília. (Tese de Doutorado)

Patentes

Não se aplica

Tecnologia, Serviços e Produtos

Não se aplica

Transferência de Tecnologia e de Conhecimentos

As ações decorrentes dos resultados deste subprojeto são atividades do subprojeto 05.2002.001-04 e nele são relatadas.

Planejado/Realizado

Metas fins constantes no projeto que foram alcançadas:

1. Determinação da taxa de reinfecção em alho-semente livre de vírus e o efeito na produção e qualidade (tamanho dos bulbos) do alho-consumo, em pelo menos três locais diferentes 2002 e 2003;
2. Determinação de espécies prevalentes nas epidemias de vírus em alho;
3. Determinação do padrão espacial da disseminação de vírus em alho;
4. Elaboração de um trabalhos científico completo para submissão à revistas indexadas até dezembro de 2004
5. Apresentação de um resumo em congressos de sociedades científicas.

Equipe Técnica

Embrapa Hortaliças:

André Nepomuceno Dusi, responsável, 20% 2002-2003

Antonio Carlos Torres, membro, 5% 2002-2003

Francisco Vilela Resende, membro, 5% 2002-2003

Universidade de Brasília:

Renato de Oliveira Resende, membro, 5%

Péricles Albuquerque de Melo Filho, membro, 50% (aluno da pós-graduação)

Avaliação Global do Andamento

Projeto concluído atingindo-se as metas previstas.

Situação Geral do Subprojeto

Avaliação do responsável: Concluído

Avaliação do líder (quantitativa): 10

Anexos

Tabela 1. Tratamentos empregados nos experimentos de degenerescência de plantas de alho.

Tratamento	Água Fria		Gama				NVTT ¹
	1999	2000	1999	2000	2001	2002	
T1	X	X	X	X	X	X	6
T2	X	X	X	X	X	X	6
T3	X	X	X	X	X	X	6
T4	X	X	X	X	X	X	6
T5	-	X	-	X	X	X	4
T6	-	-	-	-	X	X	2
T7	-	-	-	-	-	X	1
T8 ²	X	X	X	X	X	X	6
Nº de tratamentos por experimento	5	6	5	6	7	8	

¹ NVTT – número de vezes em que o tratamento foi testado nos seis experimentos.

² controle.

Tabela 2. Características avaliadas nos experimentos de degenerescência de plantas de alho infectadas por vírus.

Característica	Época de Avaliação			
	1999	2000	2001	2002
altura de plantas (cm)	60 e 90 dap ¹	90 dap	90 dap	90 dap
número de folhas	60 e 90 dap	-	-	-
peso total de bulbos (g)	30 dac ²	30 dac	30 dac	30 dac
Peso médio de bulbos	30 dac	30 dac	30 dac	30 dac
Classificação comercial de bulbos	30 dac	30 dac	30 dac	30 dac
Porcentagem de infecção viral (%)	60 e 90 dap	fim do ciclo	fim do ciclo	fim do ciclo
Presença de afídeos	todo o ciclo	Todo o ciclo	-	-

¹ dap - dias após o plantio.

² dac - dias após a colheita.

Tabela 3. Padrões de classificação comercial de bulbos de alho baseado no diâmetro da região equatorial do bulbo estabelecido pela peneira de classificação do classificador BR 100/60 da Yok Equipamentos.

Classes Diâmetro (mm)
3 até 37
4 entre 37 e 42
5 entre 42 e 47
6 entre 47 e 56
7 acima de 56

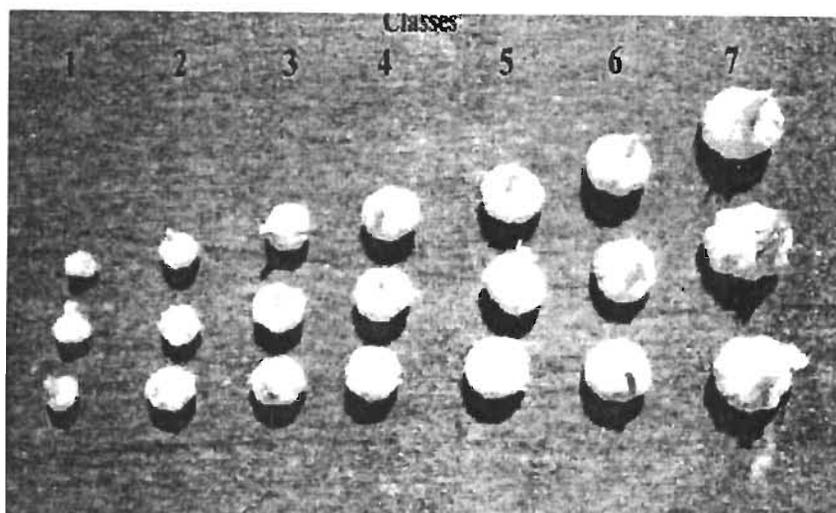


Figura 1. Aspecto fenológico da classificação comercial de bulbos de alho



Figura 2. Armadilha de bandeja amarela de água utilizada para captura de afídeos associados aos experimentos de degenerescência provocada por vírus em alho.

Tabela 4. Análise de variância de número de folhas dos experimentos de degenerescência conduzidos em Água Fria/GO e Gama/DF, 1999.

Fonte de variação	de GL	Água Fria		Gama	
		Q. médio	P	Q. médio	P
Bloco (B)	5	0,15		4,51	
Tratamento (T)	4	4,67	< 0,0001	7,17	0,1665
B X T (erro a)	20	0,29		3,96	
Época (E)	1	174,76	< 0,0001	15,3	< 0,0001
E X T	4	0,78	0,0456	0,27	0,6004
Erro b	25	0,27		0,39	
CV %		5,57		6,95	
Média		9,16		9,00	

Tabela 5. Comparação entre médias para número de folhas de plantas de alho originalmente livres de vírus e submetidas a vários ciclos de exposição, vs. plantas infectadas obtidas nos experimentos conduzidos em Água Fria e no Gama, 1999.

Tratamento (exposição)	Água Fria¹	Gama¹
T1	9,9 b	9,5 a
T2	11,9 a	8,7 a
T3	10,6 b	10,0 a
T4	11,4 a	8,0 a
T8	10,4 b	8,8 a

1 - médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey $\leq 5\%$.

Tabela 6. Análise de variância para altura de plantas dos experimentos de degenerescência conduzidos em Água Fria/GO e Gama/DF, 1999.

Fonte de variação	GL	Água Fria		Gama	
		Q. Médio	P	Q. Médio	P
Bloco (B)	5	8,97		36,60	
Tratamento (T)	4	78,71	0,0037	202,12	< 0,0001
B x T (erro a)	20	14,25		16,21	
Época (E)	1	1154,57	< 0,0001	877,84	< 0,0001
E x T	4	3,57	0,8322	6,01	0,4945
Erro b	25	9,82		0,39	
CV (%)		8,45		5,57	
Média		37,08		47,09	

Tabela 7. Comparação entre médias para altura de plantas de alho originalmente livres de vírus e submetidas a vários ciclos de exposição, vs. plantas infectadas, obtidas aos 90 dias após o plantio nos experimentos conduzidos em Água Fria/GO e no Gama/DF, 1999.

Tratamento (exposição)	Água Fria¹	Gama¹
T1	38,72a	50,12a
T2	38,79a	50,67a
T3	36,64a	46,43a
T4	38,47a	47,81a
T8	32,78b	40,42b

1 - médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey $\leq 5\%$.



Figura 3. Diâmetro do pseudocaulo de plantas de alho originalmente livres de vírus (1) e infectadas (2 - material do agricultor) pelo complexo viral associado à cultura.

Tabela 8. Estimativas dos componentes de variância e testes de hipótese para os dados de: produtividade, peso médio de bulbos e altura de plantas aos 90 dap, obtidos com uso do procedimento Mixed (SAS 1999).

Componentes de variância	Produtividade (t/ha)	Peso médio de bulbos (g)	Altura de plantas (cm)
Ambiente	0,1568	17,8706	31,8361
Bloco (Ambiente)	0,0079	1,5055	3,5573
Tratamento x Ambiente	0,0022	1,2288	0,7206
Resíduo	0,0246	6,2163	19,2837
Teste para efeito de tratamento			
F ¹	32,08	12,28	16,44
P	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Média	6,50	13,43	47,55

1 - Teste de F realizado com 7 GL no numerador e 24 GL no denominador

Tabela 9. Estimativas das médias dos caracteres agrônômicos de plantas de alho livres de vírus e infectadas estimadas a partir da análise conjunta de seis experimentos conduzidos em Água Fria/GO e no Gama/DF, no período de 1999 a 2002.

Tratamento	Altura de plantas (cm)		Peso médio de bulbos (g)		Produtividade (t /ha)		APRC ⁴ (%)
	Média (epm) ¹	DRC ²	Média (epm)	DRC	Média (epm)	DRC	
T1	52,19 (2,46)	10,95	17,22 (1,84)	7,19	10,74 (1,25)	5,81	117,85
T2	49,62 (2,46)	8,37	15,94 (1,84)	5,92	8,82 (1,25)	3,89	78,91
T3	47,97 (2,46)	6,72	13,64 (1,84)	3,61	7,71 (1,25)	2,77	56,39
T4	47,15 (2,46)	5,91	13,14 (1,84)	3,11	7,43 (1,25)	2,50	50,71
T5	45,60 (2,54)	4,36	12,60 (1,90)	2,57 ³	6,86 (1,28)	1,93	39,15
T6	43,23 (2,75)	1,99 ³	12,40 (2,07)	2,37 ³	6,55 (1,37)	1,62 ³	32,86
T7	42,58 (3,13)	1,33 ³	13,23 (2,36)	3,22 ³	6,48 (1,54)	1,55 ³	31,44
T8	41,24 (2,46)	-	10,03 1,84	-	4,93 (1,25)	-	-

1 – erro padrão da média

2 – diferença em relação ao controle avaliada com o teste de Dunnett bilateral a 1 %

3 – não há diferença significativa em relação ao controle

4 – aumento de produtividade em relação ao controle considerando 4,93 = 100 %

Tabela 10. Redução em produtividade vs. redução em altura de plantas de alho expostas à infecção viral em seis experimentos conduzidos em Água Fria/GO e Gama/DF.

Contraste entre exposições	Redução em altura de plantas (%)	Redução em produtividade (%)
1 com 2	4,9	17,9
1 com 3	8,1	28,2
1 com 4	9,7	30,8
1 com 5	12,6	41,6
1 com 6	17,2	50,8
1 com 7	18,4	61,9

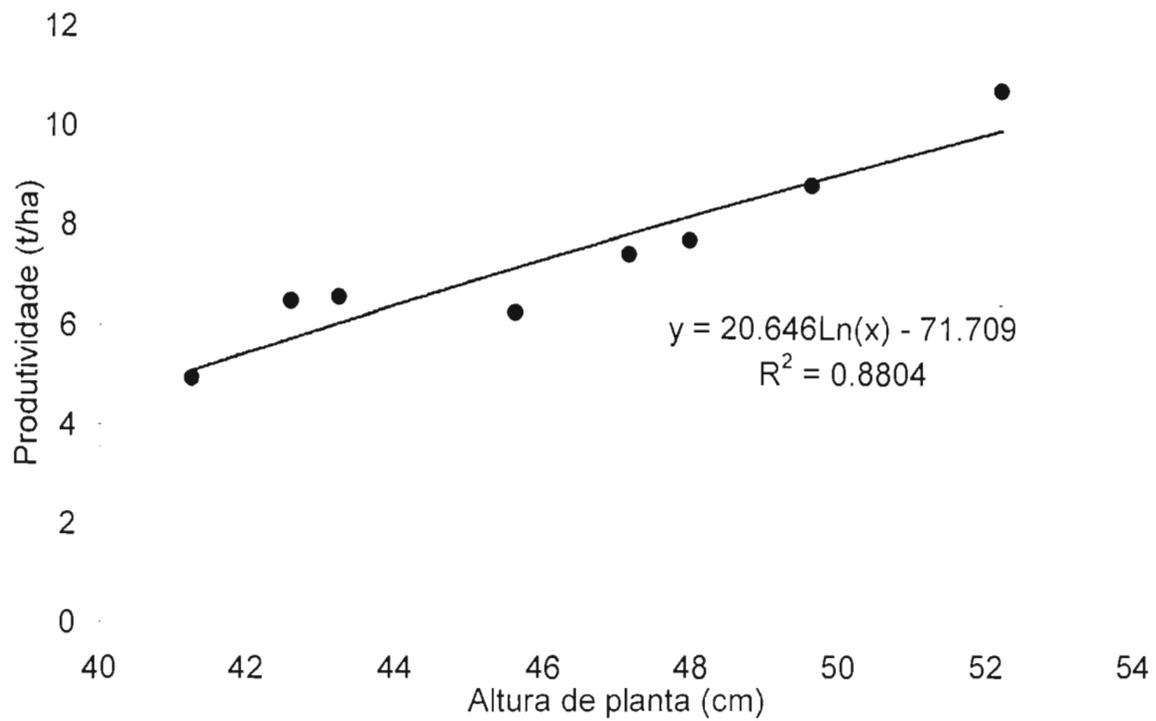


Figura 4. Altura de plantas vs. produtividade. Valores de produtividade e altura de plantas estimados pelo procedimento mixed (SAS, 1999) em função do número de exposições a campo a um complexo viral associado à cultura do alho.

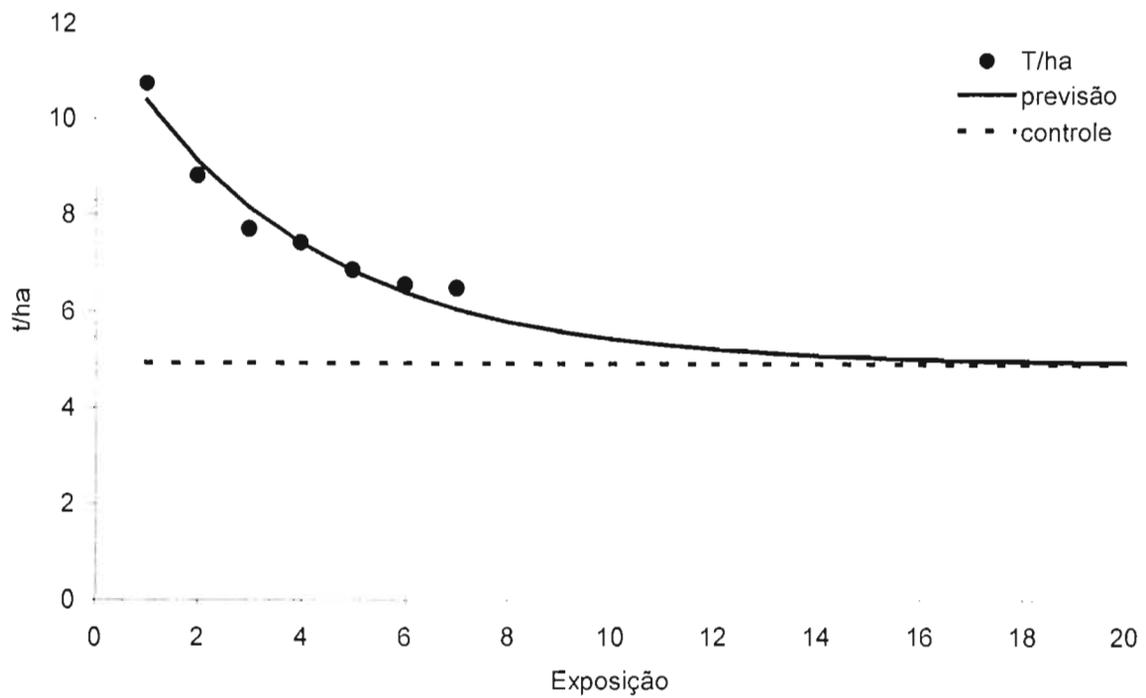


Figura 5. Comportamento da produtividade de plantas de alho obtidas a partir de bulbilhos originalmente livres de vírus ao longo de sete exposições a campo ao complexo viral associado à cultura. Modelo exponencial negativo para previsão de produção ao longo dos anos de exposição. ($y = 7,080 \cdot \exp(-0,262 \cdot x) + 4,93$; $r^2 = 0,965$)

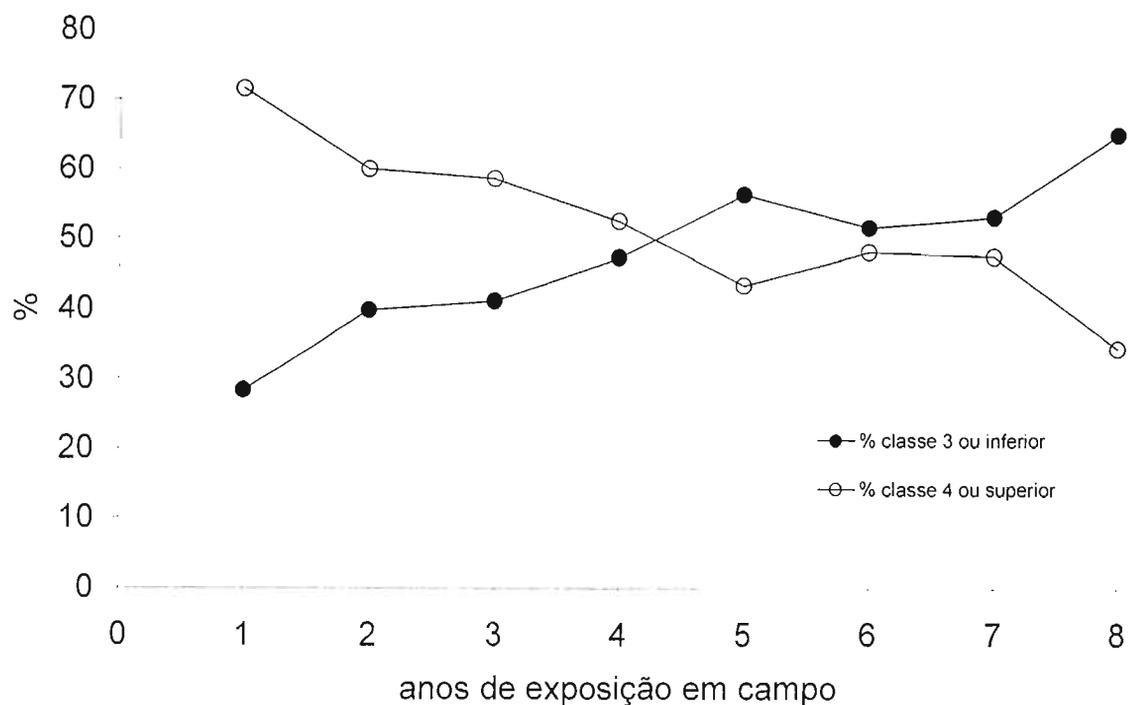


Figura 6. Classificação comercial de bulbos de alho obtida nos seis experimentos conduzidos em Água Fria/GO e no Gama/DF, após sucessivas exposições a campo à infecção provocada por vírus.

Tabela 11. Porcentagem de bulbos de alho classificados nas classes de 4 a 7 para cada ciclo de exposição obtidos em seis experimentos de campo.

Classes	Tratamento							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
4	23,82	19,31	24,82	21,75	21,15	17,19	28,25	18,69
5	22,01	17,50	17,53	17,58	13,51	18,38	10,01	11,01
6	21,31	19,41	14,84	12,03	8,52	12,00	6,92	4,53
7	4,51	3,88	1,56	1,23	0,32	0,68	2,50	0,46
Total	71,65	60,10	58,75	52,59	43,50	48,25	47,68	34,69

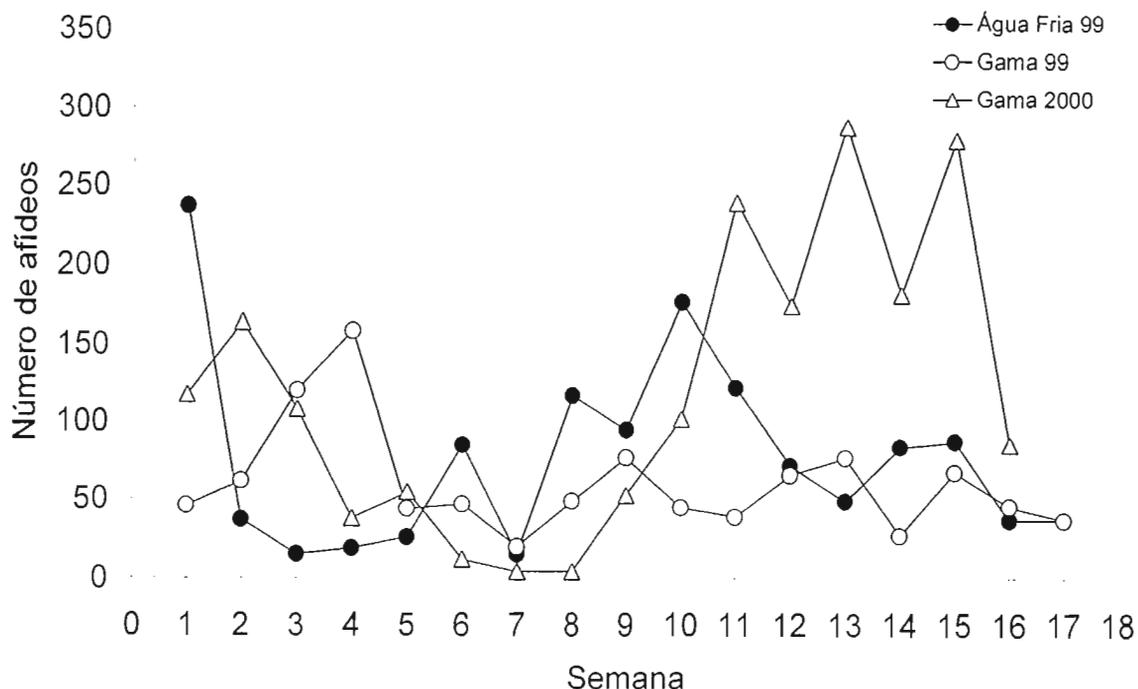


Figura 7. Número de afídeos coletados a partir do segundo mês de vida das plantas de alho nos experimentos conduzidos em Água Fria e no Gama.

Tabela 12. Porcentagem de infecção provocada pelo complexo viral, OYDV e LYSV em plantas de alho com uma a sete exposições a campo no experimento de degenerescência conduzido no Gama em 2002 (Dados avaliados por Dot-Elisa). Valores correspondem à média de seis repetições, com cinco plantas por repetição.

Tratamento	Complexo viral (%)	OYDV (%)	LYSV (%)
T1	26,7	23,3	3,3
T2	83,3	80,0	26,6
T3	60,0	43,3	36,7
T4	86,7	100,0	93,3
T5	100,0	100,0	80,0
T6	96,7	100,0	96,7
T7	100,0	100,0	100,0
T8	100,0	100,0	100,0

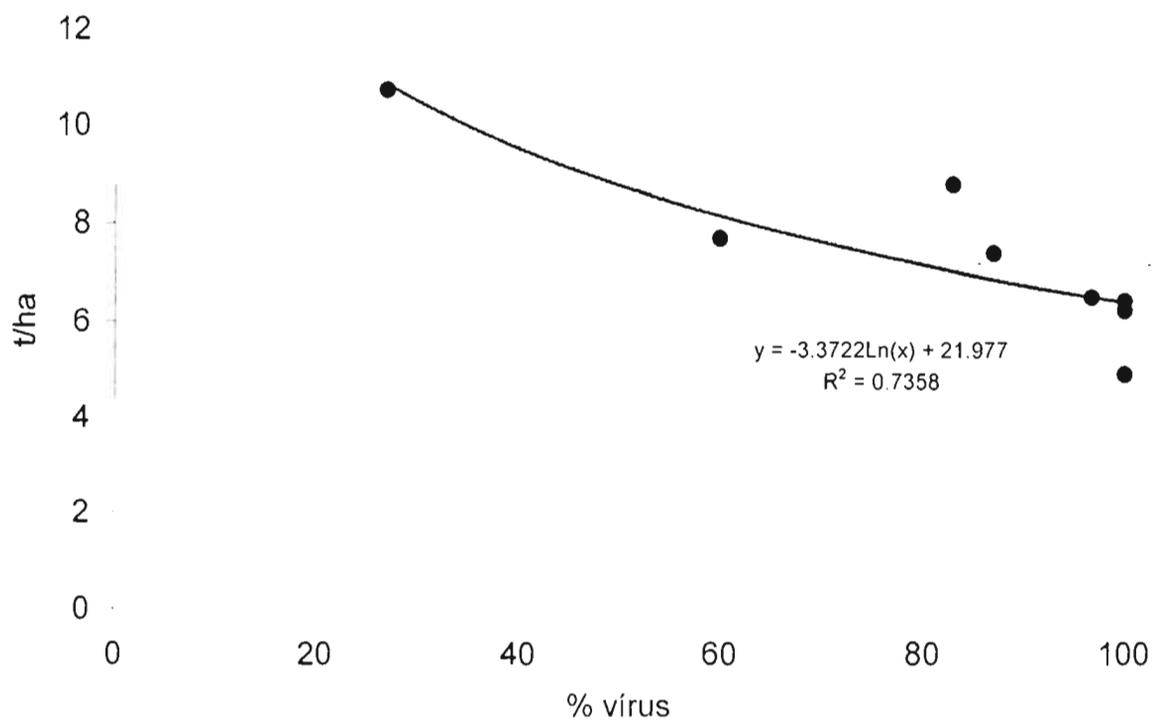


Figura 8 Porcentagem de infecção de plantas de alho vs. produtividade.

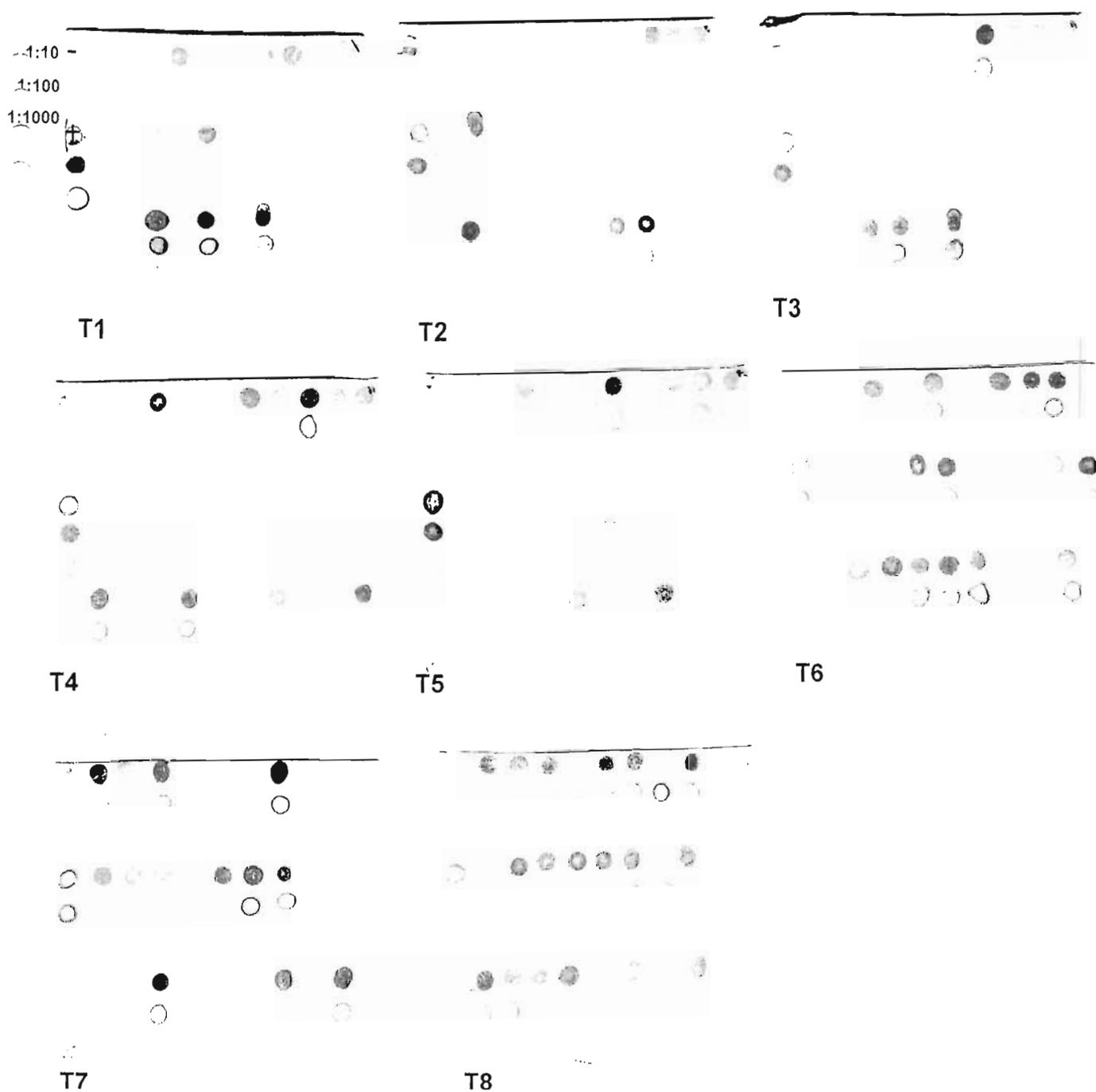


Figura 9. Membranas de dot-Elisa. T1 a T8, tratamentos; -, controle negativo; + controle positivo; 1:10, 1:100, 1:1000, diluições das amostras; 30 amostras por tratamento.

Tabela 13 Esquema de multiplicação de bulbilhos-semente de alho empregado no sistema proposto pela Embrapa Hortaliças e produtividade esperada em cada ciclo de exposição viral.

	1º ano	2º ano	3º ano	4º ano	5º ano	6º ano	7º ano	8º ano
Plantio ¹	1.800 (telado)	9.000 (campo)	63.000 (campo)	441.000 (campo)	3.087.000 (campo)	21.609.000 (campo)	151.263.000 (campo)	1.058.841.00 0 (campo)
Área (m ²)	18	200	1.500	10.000	70.000	490.000	3.430.000	24.010.000
GPE ²	-	117,85	78,91	56,34	50,71	39,15	32,86	31,44
Produção ¹	12.600	63.000	441.000	3.087.000	21.609.00	151.263.00	1.058.841.00	7.411.887.00
					0	0	0	0
Exposição	0	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a
VC (t) ³	-	-	-	7,0	47,5	306,8	2.050,7	14.201,4

1 – número estimado de bulbilhos

2 – ganho mínimo em produtividade estimado

3 – volume a ser comercializado.

Tabela 14. Produtividade do ensaio de Burity (MG).

Tratamento	t/ha ¹	EPM ²
T1	8.19 ab	0.334
T2	9.47 a	0.455
T3	7.31 b	0.443
T4	3.01 c	0.055

1 - tratamentos seguidos da mesma letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $\leq 5\%$;

2 - erro padrão da média.

Tabela 15. Estande final do ensaio.

Tratamento	% colhido ¹	EPM ²
T1	99.6 a	2.40
T2	91.6 a	3.54
T3	71.0 b	3.31
T4	76.3 b	2.25

1 - tratamentos seguidos da mesma letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $\leq 5\%$;

2 - erro padrão da média.

Tabela 16. Distribuição de frequência (em %) dos bulbos nas diferentes classes

Tratamento	Classes							7 total	%>5
	1	2	3	4	5	6			
T1	0.8	4.0	12.4	26.4	30.8	22.4	3.2	100	56
T2	0.2	1.3	7.0	20.3	35.1	27.3	8.8	100	71
T3	0.5	3.7	8.1	18.6	25.7	33.9	9.5	100	69
T4	4.9	21.5	22.8	28.6	17.3	5.0	0.0	100	22

Tabela 17. Porcentagem de infecção determinadas por Dot-Elisa utilizando-se anti-soros polivalente e específicos para OYDV e LYSV.¹

Tratamento	% Polivalente ²	% OYDV ³	% LYSV ⁴
T1	35 a	16 a	15 a
T2	37 a	8 a	33 ab
T3	42 a	50 b	45 b
T4	91 b	81 c	79 c

1- tratamentos seguidos da mesma letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $\leq 5\%$.

2- infecção total determinada por sorologia com anti-soro polivalente;

3- infecção com OYDV determinada por sorologia com anti-soro específico;

4- infecção com LYSV determinada por sorologia com anti-soro específico;

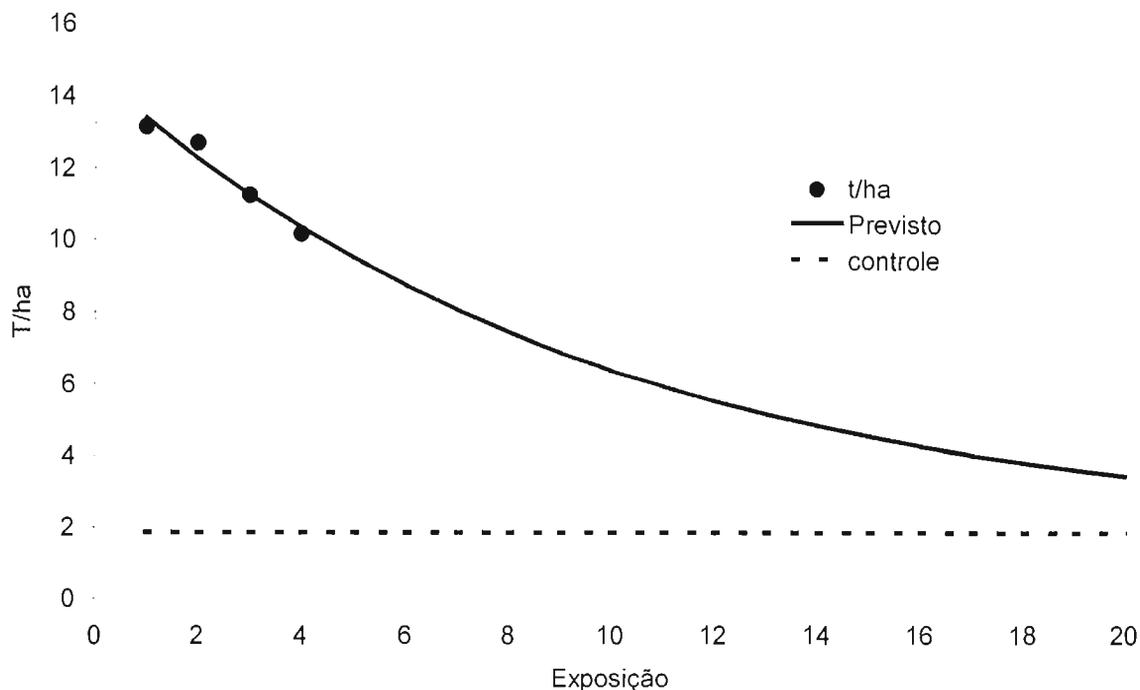


Figura 10. Comportamento da produtividade de plantas de alho obtidas a partir de bulbilhos originalmente livres de vírus ao longo de quatro exposições a campo ao complexo viral associado à cultura. Modelo exponencial negativo para previsão de produção ao longo dos anos de exposição. ($y = 12,808 \cdot \exp(-0,103 \cdot x) + 1,858$; $r^2 = 0,95$).

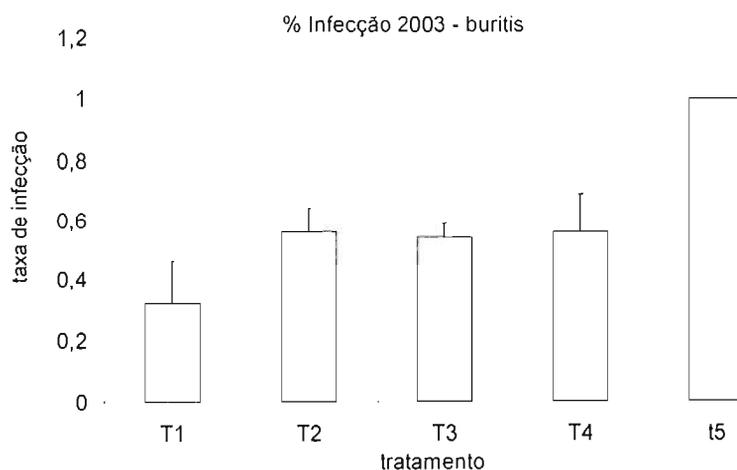


Figura 11. Taxa de reinfeção do ensaio de Buritis em 2003, após quebra da dormência dos bulbos colhidos.

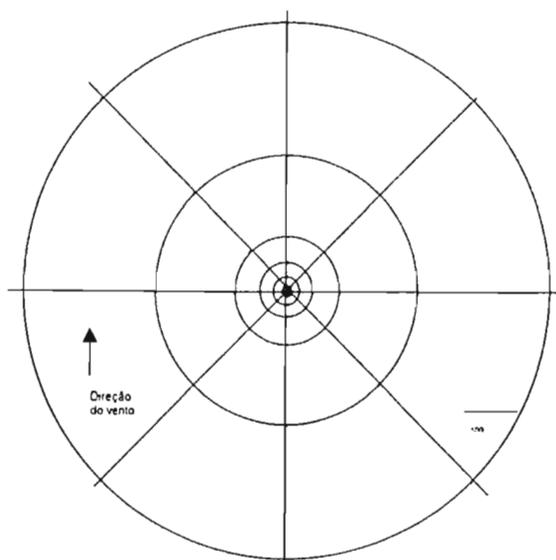


Figura 12. Croqui do experimento para estudos epidemiológicos de vírus em alho-semente em condições de campo.

Tabela 18. Avaliação preliminar dos dados do experimento de degenerescência em Buritis, MG, 2003.

Tratamento	t/ha ¹	EPM ²	% colhido	EPM ²
T1	13.16 a	0.1757	91.8 a	1.848
T2	12.72 a	0.2862	95.1 a	1.495
T3	11.25 ab	0.3480	89.9 a	2.699
T4	10.18 b	1.1093	85.4 a	4.238
T5	1.86 c	0.2910	38.0 b	4.272

1 - tratamentos seguidos da mesma letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $\leq 5\%$;

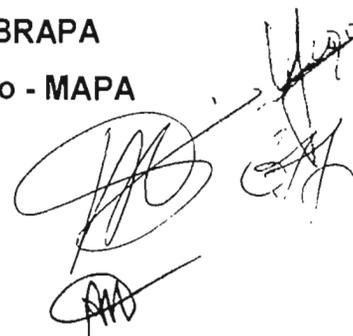
2 - erro padrão da média.

Tabela 19. Porcentagens de infecção nos diferentes raios.

Tratamento	% Polivalente²	% OYDV³	% LYSV⁴
Raio 1	6,3	5,0	3,8
Raio 2	2,5	2,5	0
Raio 3	0	0	0
Raio 4	0	0	0
Raio 5	0,6	0,6	0,6

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento - MAPA

Espelho de Relatório Final de Subprojeto



Identificação do Subprojeto

Ano de Elaboração do relatório: 2005

Código: 05.2002.001-04

Título: Ações de validação e difusão de tecnologias em alho-semente livre de vírus

Unidade executora: Embrapa Hortaliças

Responsável: Francisco Vilela Resende

Data efetiva de início: 01/01/2002

Data de término: 31/12/2004

Parceiros: Embrapa Hortaliças, EBDA (Barreiras, Cristópolis, Boninal/Novo Horizonte, Jacobina), Prefeitura municipal de Cristópolis, Prefeitura municipal de Gouveia, EMATER – MG (Gouveia e Itumirim), Sebrae – BA, Apolônio Louback Filho (Capelinha), UFLA.

Projeto ao qual está vinculado

Título: Desenvolvimento de Tecnologia de Produção de Alho-Semente Livre de Vírus - Fase III

Líder: André Nepomuceno Dusi

Resumo

As unidades de observação, validação e demonstração visam obter tecnologias acabadas a partir de resultados promissores obtidos em trabalhos experimentais nos centros de pesquisa. Este subprojeto tem como objetivo avaliar um sistema de produção de alho semente livre de vírus para pequenos produtores de forma a torná-los auto-suficientes e melhorar a qualidade do alho-semente atualmente em uso. Duas unidades de observação do alho livre de vírus foram implementadas junto a produtores orgânicos no Distrito Federal em abril de 2002 e pequenos produtores de alho da região de Cristópolis – BA em junho de 2002. Foram realizadas seis unidades de observação/demonstração de alho Amarante livre de vírus, duas com produtores orgânicos do Distrito Federal e quatro com pequenos produtores de Cristópolis – BA. Na UO implantadas no DF o Amarante livre de vírus foi comparada com as cultivares Amarante infectada e Hozan e em Cristópolis, com cultivares utilizadas por produtores

locais (Cateto Roxo e Amarante). Em uma propriedade de Cristópolis e uma de Mirangaba-BA (região de Jacobina) foi instalado um telado de 20 m² e um campo de multiplicação de 100 m² com alho-semente livre de vírus com intuito iniciar a validação do sistema próprio de produção de alho semente. Entretanto, não foi possível obter dados desta unidade em função da incidência de ventos fortes que inutilizou o telado e por isso a unidade foi abandonada pelo produtor. Na região de Jacobina (BA) foram obtidas produções de 20 kg de bulbos curados (1,12 kg/m²) no telado e 256 kg de bulbos curados (0,90 kg/m²) fora do telado. A produtividade da cultivar Amarante livre de vírus variou de 7,0 a 11,7 t/ha em Cristópolis cuja produtividade média municipal neste mesmo ano foi 4,5 t/ha. A taxa de multiplicação do Amarante livre vírus nesta região variou de 9 – 20 para 1. No DF foram obtidas produtividades médias para Amarante LV, Amarante e Hozan de 18,5, 12,4 e 12,8 t/ha respectivamente, em sistema orgânico com cobertura morta de solo e 9,0; 7,0 e 7,0 t/ha sem cobertura morta. As taxas de multiplicação variaram de 11,4 a 23,1 para Amarante LV, 9,7 a 15,0 para Amarante e 11,5 a 12,6 para Hozan. Em 2003 foram realizadas as seguintes atividades em Cristópolis: foram instaladas cinco unidades de validação de produção própria de alho semente livre de vírus; duas unidades de observação da cultivar Hozan; um experimento e uma unidade de observação para introdução do cultivo de alho nobre; treinamento de 3 h em controle de pragas e manejo de semente em alho e colaboração na estruturação de um sistema de produção de alho para a região, em atividade conjunta com a EBDA/Barreiras. O experimento de alho nobre foi implantado com as cultivares Chonan, Caçador, Quitéria, Jonas, DDR-6024, DDR-6804, DDR-6807, RE-6811, RE-518-1 e RAL-41 em delineamento de blocos casualizados com 4 repetições. As cultivares Caçador e Jonas, devido a alta incidência de queima de folhas causada por *Stemphylium sp.*, foram colhidas em 04/08/2003 e tiveram seu rendimento bastante comprometido pela doença. Os clones mais produtivos foram o RE-6811 e RE-518-1. Na unidade de observação com a cultivar Caçador instalada pela EBDA foram coletadas quatro amostras, de 1 m² cada. A avaliação desta unidade apresentou estande final, peso de bulbo e rendimentos médios de 73,25 plantas, 15 g e 10.987,5 kg/ha, respectivamente. No experimento e na unidade foi utilizada a irrigação por microaspersão com intuito de avaliar a eficiência deste sistema na região. Foi realizado um dia de campo com a presença de 34 pessoas no dia 3 de junho e de um ciclo de palestras com 3 horas de duração no dia 4 de junho com a presença de 36 pessoas, sobre manejo de pragas e qualidade de alho semente. As produtividades das duas unidades de observação com a cultivar Hozan foram, respectivamente, 1093,4 kg/ha e

2232,0 kg/ha. As produtividades ficaram muito abaixo do esperado devido a falta de experiência dos produtores com esta cultivar. As unidades de validação de alho semente livre de vírus foram avaliadas através de amostragens nos campos de alho oriundo de semente livre de vírus e nos campos de produção de alho comum dos produtores. A alta incidência de doenças em algumas unidades comprometeu bastante o desenvolvimento e produção das plantas em algumas unidades, mas a produção de sementes foi garantida para continuidade do trabalho. A área plantada com alho semente livre de vírus em Cristópolis no ano de 2003 foi estimada em cerca de 0,5 ha. Com a semente colhida nesta área espera-se o plantio de 5 a 6 ha em 2004, 50 a 60 ha em 2005 e cerca de 600 ha em 2006. A unidade de observação com Amarante livre de vírus implantada em Novo Horizonte foi plantada em 28 de março e colhida em 8 de agosto. A parcela de primeira exposição do Amarante livre de vírus, com 47 m², produziu 250 kg de alho verde, o que dá uma produtividade de 53 t/ha. Considerando uma quebra de 30% após a cura, devido à perda d'água, a produtividade ~~estivam~~ é de 37 t/ha. Para o alho no segundo ano de exposição em campo, em um a área de 120 m², foram colhidos 550 kg, o que dá uma produtividade de 46 t/ha de alho fresco, equivalente a 33 t/ha de alho curado. Para complementar as informações dessas unidades de observação, falta apenas realizar a análise do percentual de reinfecção viral. Nos ensaios com as cultivares de alho comum, o Amarante livre de vírus destacou amplamente dos demais materiais em termos de produção, seguida da cultivar Gravatá que também apresentou desempenho satisfatório. Algumas unidades de demonstração do sistema de controle de irrigação foram montadas na em diferentes propriedades. Os agricultores ficaram satisfeitos com a praticidade do equipamento. Foram enviados folderes explicativos do produto ao escritório local da EBDA para distribuir aos produtores. O folder contém informações básicas de uso e indica os diferentes fabricantes do produto, caso eles tenham interesse em sua aquisição. Em Capelinha foram plantados aproximadamente 18.000 bulbilhos e 120.000 bulbilhos livres de vírus da cultivar Amarante, respectivamente, em áreas de 36 m² de telado e 200 m² no campo a céu aberto. Foi montado um campo de observação/demonstração para introdução na região da cultivar Hozan. O plantio foi realizado em 10/04/2003 e a colheita em 17/09/2003. Foram colhidos aproximadamente 80 kg de bulbos curados nos telados (2,2 kg/m²) e 400 kg de bulbos curados nas áreas de campo, obtendc-se produtividade de 15,0 t/ha. Na unidade de observação/demonstração da cultivar Hozan obteve-se uma produtividade aproximada de 10,5 t/ha. Em Gouveia, as unidades foram instaladas nas comunidades Cuiabá e Alpes, principais produtoras de alho do

município. Os plantios foram realizados em 14/05/2003 e a colheita em 25/09/2003. Na comunidade Cuiabá foram instaladas unidades de 10 m² de Amarante livre de vírus e Hozan e na comunidade Alpes 8,3 m² de Hozan e 9,7 m² de Amarante livre de vírus. Nestas unidades foram comparados também o sistema de manejo tradicional do produtor local (adubação orgânica localizada e plantio a lanço sem espaçamento definido) com o sistema proposto pela EMATER – MG (adubação orgânica + química incorporada em área total do canteiro e espaçamento 20 x 10 cm). Os dados das avaliações destas unidades ainda não foram enviados à Embrapa Hortaliças pelos técnicos da EMATER – MG.

Em 2004 iniciou-se em Cristópolis a última etapa do processo de produção de alho-semente livre de vírus. Os produtores que estão conduzindo as unidades terão em 2005 alho-semente suficiente para plantio de 1 ha de alho que será destinado para comercialização. Os resultados das avaliações das quatro unidades estão apresentados nas tabelas 5 a 8 do anexo. Em 2004 foram plantados cerca de 3 ha com alho semente livre de vírus em Cristópolis e em 2005 são esperados de 15 a 20 ha.

Em Boninal/Novo Horizonte foram implantadas duas unidades de multiplicação de alho-semente livre de vírus. Estas unidades foram constituídas por um telado antiafídeos de 18 m² e 100 m² no campo. Foram obtidos 56 kg de alho semente no telado em Boninal e 35 kg no telado em Novo Horizonte. No primeiro ano fora do telado obteve-se 12 kg e 325 kg de sementes, respectivamente, em Boninal e Novo Horizonte. Em Novo Horizonte foi plantada uma área de 3.560 m² a partir de alho-semente de um campo demonstrativo implantado em 2003. Nesta área foi obtida uma produção de 7.500 kg de alho-semente de alta qualidade. O produtor já repassou cerca de 5.000 kg deste alho semente para outros produtores da região. Espera-se plantar 10 a 15 ha com esta semente em 2005, parte para uso comercial.

Em Capelinha em 2004, somando as áreas de telado e campo foi possível o plantio de aproximadamente 180 kg de alho-semente de alta qualidade numa área de aproximadamente 0,5 ha. Com esta área estima-se um plantio de aproximadamente 5 ha em 2005. Foram colhidos nesta unidade aproximadamente 3.500 kg de alho-semente de Amarante proveniente de material livre de vírus. Em 2005, parte deste material será comercializado como alho-semente e o restante será mantido pelo produtor que deverá manter uma área contínua de cerca de 2 a 3 ha por ano de produção de alho-semente livre de vírus.

Em 2004 foi plantada, em Gouveia, uma unidade de multiplicação de alho-semente em um terreno cedido pela prefeitura municipal com um telado (2.000

bulbilhos) e área de campo com 9.000 bulbilhos livres de vírus. Foram plantados 261 m² de alho Amarante livre de vírus de primeira e segunda multiplicação em campo. Na mesma área da prefeitura foram multiplicados também 10 kg de semente da cultivar Hozan em uma área de 56,7 m², como unidade de observação/demonstração. Os resultados destas unidades ainda não foram enviados pela Emater-MG.

Em Itumirim foram montadas unidades demonstrativas com as cultivares Chonan, Caçador e Gravatá oriundas da coleção de germoplasma de alho da UFLA e Amarante LV (2^a exposição) e Hozan da Embrapa Hortaliças. O plantio foi realizado entre 05/05 e 08/05 na Fazenda da Estância dos Srs Arlindo de Lima e Sebastião Darlei de Lima. A unidade foi implantada em uma área de aproximadamente 2.000 m², seguindo recomendações técnicas da Embrapa Hortaliças e Depto. Agricultura da UFLA, com acompanhamento técnico da Emater MG. As produtividades foram 6,5 t/ha, 11,8 t/ha, 7,8 t/ha e 8,7 t/ha para Gravatá, Amarante LV, Caçador e Chonan, respectivamente.

Foram implementadas unidades de validação e observação das cultivares Amarante livre de vírus e Hozan em diversos municípios de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraná, com o intuito de divulgar a tecnologia, inclusive em sistema orgânico de produção.

Resultados Finais

1. Atividades desenvolvidas em Cristópolis, Jacobina e Distrito Federal em 2002

Parceiros: Embrapa Hortaliças, EBDA (Barreiras/Cristópolis e Jacobina), Prefeitura Municipal de Cristópolis, EMATER – DF)

As metas previstas para este subprojeto incluem a instalação de unidades de observação/demonstração de desempenho de alho livre de vírus nas condições do produtor e validação do conceito de produção própria de alho-semente.

Foram realizadas cinco unidades de observação/demonstração com alho Amarante livre de vírus ou com uma multiplicação em condições de campo, sendo três na região de Cristópolis – BA com pequenos produtores e duas unidades no DF com produtores orgânicos. Em Cristópolis foi instalada também uma unidade piloto de multiplicação de alho-semente livre de vírus.

No DF as unidades foram implantadas em abril de 2002 em duas propriedades orgânicas nas colônias agrícolas do Rajadinha/Planaltina e Lamarão/PAD-DF. Foram

plantados 20 m² das cultivares Amaranthe livre de vírus – 2º exposição, Amaranthe convencional e Hozan. No Lamarão as unidades foram conduzidas com cobertura morta de solo, usando capim seco picado e na Rajadinha não foi utilizado cobertura de solo.

A cultivar Amaranthe Livre de vírus de 2ª exposição foi mais produtiva em relação as duas cultivares infectadas (Amarante convencional e Hozan) (Tabela 1) nas duas unidades. A unidade 1 foi conduzida com cobertura morta de solo e por isso os desempenhos de produção foram superiores.

Em Cristópolis, houve atraso na instalação das unidades em função da prefeitura municipal que ficou responsável pela aquisição de quatro telados não ter conseguido mobilizar recursos para tal até início de junho. Optou-se então pela instalação de apenas um telado da própria Embrapa e demais propriedades foram feitos plantios de alho livre de vírus de 1ª e 2ª exposição em condições de normais de cultivo. Ressalta-se que em função dos plantios bastante tardios (meados de junho) das unidades, os resultados obtidos ficaram muito aquém do esperado, levando inclusive alguns produtores a desistirem da cultura antes do final do ciclo.

Foram realizadas as seguintes atividades em Cristópolis: Na propriedade do Sr. Idelfonso Câmara foram instalados um telado de 18 m² contendo alho para semente livre de vírus, uma área de 100 m² contendo alho livre de vírus em condições de campo e 20 m² com alho no 2º ano de multiplicação no campo. Na Propriedade do Sr. Valcy Xavier foram instalados 120 m² de alho livre de vírus e 24 m² de alho 2ª exposição. Na propriedade do Sr. Adécio Brandão, 87 m² com alho livre de vírus e 34 m² com alho de 2ª exposição e finalmente 126 m² de alho livre de vírus e 11 m² de alho 2ª exposição na área do Sr. José Borges. Na área do Sr. Elizaldo Vilas Boas foi realizado um plantio de 120 m² com alho livre de vírus.

Alegando ocorrência de chuvas, as unidades foram colhidas antes das chegada da equipe da Embrapa Hortaliças à região impedindo a realização da maioria das avaliações. O telado foi danificado por ventos fortes e juntamente com o plantio tardio levou o produtor a abandonar a unidade e preparara área para outra cultura. Nesta propriedade foi possível apenas fazer uma avaliação da taxa de multiplicação do material. O Sr. José Borges também alegando o plantio tardio e o não desenvolvimento das plantas abandonou a unidade.

Nas demais propriedades, em função do alho já estar colhido e em réstias, foram possíveis apenas fazer estimativas de produção. Desta forma, a produtividade da cultivar Amaranthe livre de vírus variou de 7,0 a 11,7 t/ha em Cristópolis cuja

produtividade média municipal neste mesmo ano foi 4,5 t/ha. A taxa de multiplicação do Amaranthe livre vírus nesta região variou de 9 a 20 para 1.

Entretanto, todos os produtores que concluíram as unidades mostraram-se surpreendidos com a produtividade do alho livre de vírus, que mesmo em plantio atrasado foram superiores às cultivares da região e lamentaram o fato do plantio não ter sido feito na época adequada. Todos os produtores permaneceram no projeto e dispendo-se para instalar as unidades de observação em campo e telados no ano seguinte.

Na região de Jacobina (BA) foram plantados, no campo, 14.000 bulbilhos de Amaranthe originários de alho-semente livre de vírus plantado em 2001 e 7.000 bulbilhos em telado, enviados pela Embrapa Hortaliças. A unidade foi implantada em 28/05/2002 e colhida em 26/09/2002. Foram obtidas produções de 20 kg de bulbos curados (1,12 kg/m²) no telado e 256 kg de bulbos curados (0,90 kg/m²) fora do telado. Para safra de 2003 espera-se o plantio de aproximadamente 180.000 bulbilhos.

2 – Atividades desenvolvidas em Cristópolis em 2003

Parceiros: Embrapa Hortaliças, SEBRAE – BA, EBDA (Barreiras e Cristópolis), Prefeitura Municipal de Cristópolis,

Objetivos:

- Avaliação e validação de um sistema de produção própria de alho semente, a partir de alho livre de vírus, visando a substituição da semente local por materiais de melhor qualidade.
- Avaliação de cultivares de alho nobre, visando introdução do cultivo deste tipo de alho na região.
- Avaliação da cultivar Hozan. Cultivar de alho comum com boas características de bulbo e menor número de dentes, alternativa para cultivares de alho comum utilizadas na região.
- Treinamento de produtores em controle de pragas e seleção de semente

Atividades

- Cinco unidades de validação de produção própria de alho semente livre de vírus
- Duas unidades de observação da cultivar Hozan
- Um experimento e uma unidade de observação para introdução do cultivo de alho nobre
- Treinamento de 3 h em controle de pragas e manejo de semente em alho

- Colaboração na estruturação de um sistema de produção de alho para a região, em atividade conjunta com a EBDA/Barreiras

Descrição dos trabalhos realizados

As atividades tiveram início em fevereiro com uma visita às cinco propriedades escolhidas para instalação das unidades para escolha das áreas e planejamento das unidades juntamente com os produtores. Foi realizada uma reunião com o secretário municipal de agricultura, gerente regional e técnicos da EBDA e presidente da associação municipal de produtores de alho para acertar apoio e assistência técnica para as unidades de validação do alho livre de vírus e observação da cultivar Hozan.

Em março foram implantadas as cinco unidades previstas com o alho Amarante livre de vírus nas propriedades dos seguintes produtores: Sr. Hidelfonso Câmara (Comunidade do sítio), Sr. Valcy Xavier de Lima (comunidade da Cerquinha), José Borges de Brito (Comunidade da Pederneira), Sr. Gerulino Rodrigo de Souza (Cantinho), Sr. Adécio Messias Brandão (Mata do Cedro). Estas unidades constaram de um telado de 18 m² e um campo de produção de aproximadamente 100 m² com alho semente livre de vírus. Foram montadas duas unidades de observação com a cultivar de alho Hozan, do BAG da Embrapa Hortaliças. Esta cultivar apresenta grande potencial para melhoria da qualidade do alho comum plantado na região de Cristópolis, podendo constituir-se em mais uma opção de cultivo para os produtores daquela região. As unidades de observação com alho Hozan foram montadas nas propriedades dos Srs. José Borges de Brito e Adécio Messias Brandão.

Foi realizada uma reunião em Barreiras com os gerentes regionais da EBDA e Sebrae, o Dr. Ildeu Ferreira dos Santos e Sr. Roger Viana, respectivamente. Foi proposta uma ação para avaliação do comportamento de cultivares de alho nobre na região. Após os resultados obtidos neste ano serão elaboradas outras ações para 2004 visando a introdução do cultivo de alho nobre na região de Cristópolis. Foram programadas ainda para o ano 2003, um ciclo de palestras (treinamento) abordando manejo da cultura, controle de pragas e doenças e possibilidades de processamento.

O ensaio de competição de cultivares de alho nobre foi instalado no dia 7 de maio na propriedade do Sr. José Paulo. Neste ensaio foi testado as seguintes cultivares: Chonan, Caçador, Quitéria, Jonas e clones do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças com possibilidade de cultivo com fins comerciais (DDR-6024, DDR-6804, DDR-6807, RE-6811, RE-518-1, RAL-41). Foi adotado o sistema de produção

recomendado para a cultura do alho nobre, utilizando inclusive irrigação por microaspersão, sistema de irrigação inédito naquela região.

As unidades de validação do sistema de produção de alho semente de alta qualidade estavam sendo conduzidas conforme esperado. A unidade implantada na propriedade do Sr. Idelfonso era a única na qual as plantas apresentavam desenvolvimento insuficiente, problemas de competição com plantas daninhas e o telado sofreu dano no mecanismo de fechamento

Em Barreiras foi realizada uma reunião com Dr. Ildeu, gerente regional da EBDA na qual foi proposto que as palestras previstas nos contratos do Sebrae/BA com Cristópolis e com Novo Horizonte seria dadas conjuntamente, na primeira semana de julho, em um evento a ser coordenado pela EBDA. Entretanto, não foi possível essa articulação conjunta e o ciclo de palestras foi apresentado individualmente para cada contrato. Foi realizado um dia de campo com a presença de 34 pessoas no dia 3 de junho e de um ciclo de palestras com 3 horas de duração no dia 4 de junho com a presença de 36 pessoas, sobre manejo de pragas e qualidade de alho semente.

Em julho foi realizada nova visita às unidades de validação e observação e ao experimento de cultivares de alho nobre em Cristópolis. As unidades de validação do sistema de produção de alho semente de alta qualidade estavam sendo conduzidas conforme esperado. Na unidade implantada na propriedade do Sr. Idelfonso as plantas apresentavam desenvolvimento insuficiente, problemas de competição com plantas daninhas e o telado sofreu dano no mecanismo de fechamento. Na propriedade do Sr. Valci, houve um ataque intenso de mancha púrpura, causada por *Stemphiliium*, que queimou toda a área. Em princípio parece ter ocorrido uma série de fatores que favoreceram a epidemia, como microclima favorável, uso inadequado de agrotóxicos e tecnologia de aplicação. Na propriedade do Sr. Valdez detectamos o início de uma epidemia de mancha púrpura e recomendamos uma estratégia de controle com pulverização de agrotóxicos apropriados e manejo de irrigação. Na propriedade do Sr. Jerolino detectamos o mesmo problema do Sr. Valdez, e fizemos as mesmas recomendações. Ainda nessa propriedade, o mecanismo de fechamento do telado se rompeu. Na propriedade do Sr. Adécio, a unidade se desenvolvia bem e sem problemas. Em vista dos problemas no fechamento de dois telados, será proposta uma modificação para o próximo ano.

Em decorrência da ocorrência acentuada de mancha púrpura na região, foi levantada, entre outros fatores, a suspeita de que o pH da água estaria interferindo na eficiência dos produtos aplicados para o controle. Foi realizado um levantamento do pH

da água utilizada no preparo da calda de pulverização em diversas propriedades da região. Como resultado, detectou-se que o pH varia de 7,0 a 8,0. Este pH é alto e em pulverizações futuras será necessário proceder ao ajuste do pH da calda antes da pulverização. Os técnicos da EBDA já estão alertados desse problema e providenciando o material e as orientações necessárias.

Visando a introdução da produção de alho nobre em Cristópolis, foram conduzidos em cooperação com EBDA um ensaio de competição de cultivares e uma unidade de demonstração da tecnologia de produção deste tipo de alho. Estes trabalhos foram conduzidos sem problemas e apresentados aos produtores locais durante um dia de campo.

Em setembro foram avaliados o experimento com as cultivares de alho nobre, a unidade de observação do sistema de produção deste tipo de alho, e as unidades de validação do sistema de produção de alho semente livre de vírus.

Foi feita a colheita na propriedade do Sr. José Paulo do experimento com cultivares de alho nobre e da unidade de observação da cultivar Caçador. Estes materiais foram trazidos para o CNPH para cura e posterior avaliação. O experimento foi implantado com as cultivares Chonan, Caçador, Quitéria, Jonas, DDR-6024, DDR-6804, DDR-6807, RE-6811, RE-518-1 e RAL-41 em delineamento de blocos casualizados com 4 repetições. As cultivares Caçador e Jonas, devido a alta incidência de queima de folhas causada por *Stemphylium sp.*, foram colhidas em 04/08/2003 e tiveram seu rendimento bastante comprometido pela doença. Os clones mais produtivos foram o RE-6811 e RE-518-1. Na unidade de observação com a cultivar Caçador instalada pela EBDA foram coletadas quatro amostras, de 1 m² cada. A avaliação desta unidade apresentou estande final, peso de bulbo e rendimentos médios de 73,25 plantas, 15 g e 10.987,5 kg/ha, respectivamente. No experimento e na unidade foi utilizada a irrigação por microaspersão com intuito de avaliar a eficiência deste sistema na região.

Devido ao ciclo mais longo da cultivar Hozan não foi possível avaliação das unidades de observação desta cultivar na visita de setembro. Estas unidades serão avaliadas posteriormente pelos técnicos da EBDA, que nos encaminharão os resultados. De acordo com os dados enviados pela EBDA, as produtividades das duas unidades de observação com a cultivar Hozan foram, respectivamente, 1093,4 kg/ha e 2232,0 kg/ha. As produtividades ficaram muito abaixo do esperado devido a falta de experiência dos produtores com esta cultivar, principalmente em relação ao manejo da

irrigação. No próximo ano serão feitas modificações no sistema de produção desta cultivar para adequá-la ao sistema de cultivo do alho na região.

As unidades de validação de alho semente livre de vírus foram avaliadas através de amostragens nos campos de alho oriundo de semente livre de vírus e nos campos de produção de alho comum dos produtores. Foram feitas quatro amostras de 1 m², avaliando-se o peso das plantas (parte aérea, bulbos e raízes) e estande final. Após a colheita das unidades avaliou-se também o número de réstias produzidas. As unidades foram de 1 a 5 (tabela 2 e 3). Na unidade 5 avaliou-se apenas a produção final de réstias, pois a unidade foi colhida sem a presença do técnico da EBDA. Na unidade 02 ocorreu alta incidência de queima foliar prejudicando muito a produtividade. Entretanto ainda foi possível colher sementes para continuidade do projeto no próximo ano.

A área plantada com alho semente livre de vírus em Cristópolis no ano de 2003 foi estimada em cerca de 0,5 ha. Com a semente colhida nesta área espera-se o plantio de 5 a 6 ha em 2004, 50 a 60 ha em 2005 e cerca de 600 ha em 2006.

3 – Atividades desenvolvidas em Cristópolis em 2004

Parceiros: Embrapa Hortaliças, SEBRAE – BA, EBDA (Barreiras e Cristópolis), Prefeitura Municipal de Cristópolis,

Objetivos:

- Avaliação e validação de um sistema de produção própria de alho semente, a partir de alho livre de vírus, visando a substituição da semente local por materiais de melhor qualidade.
- Avaliação de cultivares de alho nobre, visando introdução do cultivo deste tipo de alho na região.
- Avaliação de cultivares de alho comum com boas características de bulbo e menor número de dentes, alternativa para cultivares de alho comum utilizadas na região.
- Demonstração de sistema de produção de alho nobre cultivar Caçador, irrigação por microaspersão e controle de irrigação.

Atividades

- Instalação de quatro unidades de validação de produção própria de alho semente livre de vírus

- Condução de um experimento de avaliação de cultivares e uma unidade de observação para introdução do cultivo de alho nobre
- Avaliação do uso de irrigação por microaspersão e do irrigás para controle de irrigação em alho nobre

Descrição dos trabalhos realizados

As atividades de 2004 foram iniciadas no dia 05/03 em uma com o prefeito municipal, Sr. Jair Miranda, o secretário municipal de agricultura; Sr. Josafá Oliveira e os técnicos da EBDA Aylon Laranjeira e Pedro Venício. Nesta reunião foi feito um histórico da presença da Embrapa Hortaliças com o projeto alho livre de vírus e do convênio com o Sebrae, foram relatadas as atividades de 2003 e o planejamento para 2004, bem como foram discutidas a situação atual e perspectivas do projeto até 2006, quando se pretende atender toda região de Cristópolis com alho semente livre de vírus.

Em seguida, as propriedades que receberam as unidades foram visitadas. Nestas visitas foram definidas as áreas para instalação das unidades, preparo do solo, adubação, disponibilidade de mão de obra para plantio, irrigação, etc. Os detalhes da construção e alterações na estrutura dos telados foram informados aos produtores pelo Sr. Nivaldo. Desta forma todos os detalhes foram acertados previamente para o plantio das unidades.

O plantio dos telados foi realizado pela equipe da Embrapa Hortaliças em 13 e 14/04/2004. Em alguns telados ocorreram falhas e desuniformidades na emergência das plantas, provavelmente devido a deficiência de irrigação que foi manual nos telados. Em algumas unidades ocorreram problemas com o mecanismo de fechamento dos telados. A utilização de zippers para fechamento dos telados não se mostrou eficiente e deverá ser trocado mudado para o próximo ano. Foram tomadas providências para evitar o ataque de doenças foliares que prejudicaram o andamento das unidades em 2003. Em 2004 os técnicos da EBDA recomendaram aplicações com produtos preventivos para antecipar a entrada de doenças nas lavouras. Neste ano iniciou a última etapa do processo de produção de alho-semente livre de vírus. Os produtores que estão conduzindo as unidades terão em 2005 alho-semente suficiente para plantio de 1 ha de alho que será destinado para comercialização. As unidades foram colhidas pelos produtores durante os meses de agosto e setembro e avaliadas através de amostragens realizadas pelo técnico da EBDA nos telados e campos de alho oriundo de semente livre de vírus e nos campos de produção de alho comum dos produtores. Estão sendo feitas quatro amostras de 1 m², avaliando-se o peso das

plantas (parte aérea, bulbos e raízes) e estande final e após a cura, produção total, peso médio de bulbo e classificação de bulbos por tamanho. Os resultados das avaliações das quatro unidades estão apresentados nas tabelas 5 a 8. Em 2004 foram plantados cerca de 3 ha com alho semente livre de vírus em Cristópolis e em 2005 são esperados de 15 a 20 ha.

O Sr. José Paulo, também produtor de alho, continuou se responsabilizando pelas atividades do projeto sebraetec, iniciadas em 2003. Este projeto visa introdução do cultivo de alho nobre na região de Cristópolis, introdução de cultivares alternativas de alho comum e melhoria do sistema de irrigação utilizado pelos produtores.

O experimento de alho nobre foi instalado em 05/05 com a seguinte metodologia: em Blocos casualizados (DBC) com 4 repetições e 10 tratamentos, parcelas com 1,5 m² e espaçamento de 10 cm entre plantas e 20 cm entre linhas com as seguintes cultivares: 1 - Chonan; 2 - Caçador; 3 - Quitéria; 4 - Jonas; 5 - DDR - 6024; 6 - Blanco Galego (WE-8410); 7- RE - 6811 ; 8 - RE 518-1; 9 - Roxo Caxiense, 10 - RE - 493099. Nos ensaios com cultivares de alho nobre em 2004 foram identificados dois clones de alho nobre com potencial de cultivo na região (Jonas e Caçador). Os clones RE-6811 e RE-518-1 não tiveram o mesmo desempenho de 2003, entretanto a cultivar Caçador destacou-se nos plantios de 2003 e 2004 revelando-se como uma cultivar promissora para esta região (Tabela 9), porém com produtividade bem abaixo das expectativas. Algumas das cultivares testadas não formaram bulbos nas condições Edafoclimáticas de Cristópolis.

O experimento de alho comum instalado pelos técnicos da EBDA em 28/04/2004 com a seguinte metodologia: Delineamento em Blocos casualizados (DBC) com 4 repetições e 10 tratamentos, parcelas com 1,5 m² e espaçamento de 10 cm entre plantas e 20 cm entre linhas com as seguintes cultivares: 1 - Amaranite; 2 - Gigante Lavínia; 3 - Gigante Roxão; 4 - Gravatá; 5 - Chinês Real ; 6 - Chinês São Joaquim; 7- Hozan ; 8 - Caturra; 9 - Cateto Roxo, 10 - Gigante Roxo. A colheita deste experimento foi realizada na semana de 30/08 a 03/09 e avaliada a produção total. As cultivares de alho comum ou semi-nobre, apresentaram resultados semelhantes (tabela 10). As cultivares Lavínia e Chinês Real pela suas qualidades de bulbo e produção devem ser reavaliadas em 2005, pois podem ser utilizadas como alternativas à cultivar Amaranite, único material plantado na região de Cristópolis.

A montagem da unidade de observação/demonstração de alho nobre cultivar Caçador foi feita em 08/05/2004. Foram feitas orientações e recomendações para instalação da unidade nesta propriedade que servirá de modelo e demonstração para

os demais produtores da região. Este produtor vem sendo preparado para trabalhar com alho nobre desde de 2003. A unidade foi conduzida sob a supervisão dos técnicos da EBDA. Nesta unidade será demonstrado também um sistema de irrigação por microaspersão em substituição a aspersão convencional, tradicional na região. Esta mudança esta sendo estimulada em função da escassez de água de na região que tem gerado inclusive atritos e disputas entre produtores. Na unidade de observação com a cultivar Caçador foram coletadas quatro amostras de 1m² para avaliação posterior. Nesta unidade foi utilizado irrigação por microaspersão com intuito de avaliar a eficiência deste sistema na região. A colheita desta unidade foi realizada em 11/08/2003 e as parcelas foram colocadas em galpões para cura. A produtividade ficou abaixo da expectativa em função do nível tecnológico e nível de especialização dos produtores desta região que estão abaixo das exigência desta cultivar. A produtividade da cultivar Caçador foi de 2,6 t/ha. Há necessidade de maior treinamento dos produtores principalmente em relação ao manejo da irrigação e da adubação para cultivo destes materiais.

Treinamento e transferência da tecnologia à EBDA e produtores locais: foi elaborado um comunicado técnico para orientação de técnicos e produtores sobre cultivo de alho em pequenas propriedades. Este comunicado abrange recomendações técnicas para o cultivo de alho nobre e comum baseado no sistemas de produção adotado na região.

4 – Atividades desenvolvidas em Boninal e Novo Horizonte em 2003

Parceiros: Embrapa Hortaliças, SEBRAE – BA, EBDA (Boninal/Novo Horizonte)

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades em Novo Horizonte iniciaram-se efetivamente em fevereiro de 2003, mesmo antes da efetivação do contrato, com o envio das sementes de alho livre de vírus. O motivo para a antecipação foi que as atividades com alho livre de vírus e o alho comum, por razões de ordem técnica, teriam que ser plantados até o fim de março.

De 8 a 10 de maio, a região alvo do trabalho foi visitada pelos pesquisadores André Nepomuceno Dusi e Francisco Vilela Resende. Na ocasião, as atividades desenvolvidas no local foram:

a) Visita ao plantio da semente livre de vírus, plantada na segunda quinzena de março.

A visita a este plantio demonstrativo foi realizada com acompanhamento de um

grupo de 10 produtores locais e dos pesquisadores da EBDA de Boninal e Seabra (Drs. Humberto e José Orlando). O alho livre de vírus apresentava-se com maior desenvolvimento que o alho comum utilizado pelos produtores locais, plantado na mesma época. A figura 6 mostra o plantio visitado em 08/05/03, com cerca de 40 dias após o plantio.

- b) Visita e implantação de um ensaio de competição de cultivares de alho comum. As semente para o plantio realizado entre 20 e 25 de abril foi remetida por transporte terrestre, e o primeiro ensaio de competição de cultivares de alho comum foi implantado pelo Dr. Humberto, da EBDA, na propriedade do Sr. Carlos. No dia 9 de maio, o segundo ensaio foi implantado na mesma propriedade, e as sementes para o terceiro plantio, previsto em torno do dia 20 de maio foram entregues ao Dr. Humberto. A figura 7 apresenta uma vista geral do primeiro ensaio implementado no fim de abril.
- c) Durante a visita à região, foi detectado um problema de amarelecimento de plantas em toda a região. O diagnóstico do problema foi de uma desordem de natureza fisiológica, provocada por plantio antecipado com alta temperatura e alta umidade. Foi proposto aos técnicos da EBDA a instalação, no próximo ano, de um ensaio para ajuste da época de plantio e do período de vernalização para a região. As reboleiras amareladas coincidiam com locais de depressão com acúmulo de água e baixa drenagem. Entretanto, os produtores não aceitam este diagnóstico e procuram a todo custo algum agrotóxico para ser aplicado nas lavouras. Amostras do material foram levadas ao laboratório de fitopatologia da Embrapa Hortaliças, que confirmou nosso diagnóstico. Não foi encontrado nenhum patógeno no material examinado. A recomendação é de que se realize, na próxima safra, o plantio em época mais adequada, evitando-se a antecipação acentuada de data. E que não se use nenhum agrotóxico sem a recomendação expressa da assistência técnica. Foram detectados também problemas no sistema de produção de alho como o uso indiscriminado de agrotóxicos, plantio morro abaixo, uso de canteiros muito largos e necessidade de melhor controle de irrigação. Com relação ao controle de água de irrigação, foram enviados à região, para fins demonstrativos, cinco equipamentos Irrigas. Esses pequenos equipamentos desenvolvidos na Embrapa Hortaliças são de fácil instalação e manuseio, baixo custo, e permitem a identificação do momento da irrigação, proporcionando economia de água e aplicação de quantidade

adequada de água na lavoura. O endereço na internet abaixo contém informações detalhadas sobre os equipamentos enviados:

<http://www.cnph.embrapa.br/novidade/prelancamento/irrigas/irrigas.html>

No dia primeiro de julho de 2003, uma nova visita dos Drs. André Nepomuceno Dusi e Francisco Vilela Resende foi realizada na região. Os Drs. Humberto e José Orlando, da EBDA, também acompanharam a visita. Na ocasião, foi entregue ao Dr. Humberto, o técnico da EBDA responsável pela assistência técnica no local, uma publicação da Embrapa Hortaliças sobre manejo da cultura do alho (Instrução Técnica n. 2) e um conjunto de três apresentações em Power Point, contendo informações detalhadas e fartamente ilustradas sobre:

- 1) Manejo de Pragas: descrição dos principais insetos e patógenos que ocorrem na cultura do alho, com informações para sua identificação, condições ideais de ocorrência e medidas recomendadas de controle. Junto com esse material, foi entregue também uma relação atualizada em 12 de junho de 2003 de todos os agrotóxicos registrados para a cultura do alho, juntamente com o telefone do setor do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento responsável pelo registro de agrotóxicos, para verificação de atualizações futuras;
- 2) Manejo de alho-semente: descrição detalhada de procedimentos para produção, classificação e seleção, tratamento de alho-semente, principalmente em função da introdução de semente de outras regiões. São apresentadas algumas alternativas de sistemas de plantio visando adensamento e ajustes de estande.
- 3) Critérios fitossanitários para alho-semente: indicação de reconhecimento de semente de alho com alta qualidade fitossanitária.

Após a entrega do material, foi acertado com a equipe da EBDA um ciclo de palestras aos produtores locais abordando aspectos diversos de manejo da cultura do alho, a ser realizado no dia 20 de setembro de 2003, por ocasião de um evento regional que a EBDA está organizando para os produtores locais. Posteriormente foram realizadas as seguintes atividades de campo:

- a) Visita ao plantio de alho livre de vírus: O plantio, nessa data com cerca de 90 dias, apresentava plantas com desenvolvimento vigoroso, destacando-se do alho comum plantado pelo produtor. As figuras 8, 9 e 10 ilustram o desenvolvimento das plantas.
- b) Visita aos ensaios de competição de cultivares de alho comum. Os ensaios de avaliação de cultivares estão sendo conduzidos sem problemas. Está programada a

colheita dos ensaios para o mês de setembro (primeiro plantio) e outubro (terceiro plantio), quando será programado um dia de campo para demonstração dos resultados aos produtores locais.

- c) Irrigas: Os equipamentos enviados para a região foram colocados em diferentes propriedades. Os agricultores estão satisfeitos com a praticidade do equipamento. Foram enviados folderes explicativos do produto ao escritório local da EBDA para distribuir aos produtores. O folder contém informações básicas de uso e indica os diferentes fabricantes do produto, caso eles tenham interesse em sua aquisição.
- d) Foi realizada uma visita às áreas onde ocorreu o problema de amarelecimento de plantas relatado anteriormente. Os plantios realizados com antecipação de data estavam sendo colhidos, e resultaram em baixa produtividade. Entretanto, os plantios mais tardios não sofreram com o amarelecimento e há uma boa expectativa de colheita. A figura 11 ilustra a baixa produção, refletido no pequeno tamanho dos bulbos colhidos.
- e) Tecnologia de irrigação: foi identificada uma intervenção urgente da Embrapa Hortaliças nas regiões visitadas para melhoria da tecnologia de irrigação utilizada. Há predomínio do uso de aspersores convencionais, que utiliza muita energia e desperdiça água, que é retirada de poços artesianos. Além da questão de economia, nota-se uma aplicação de lâminas de água excessivas bem como de uso inadequado de frequência de irrigação, o que tem levado a um desenvolvimento superficial do sistema radicular das plantas. Os técnicos da Embrapa Hortaliças que atuam na área de irrigação serão envolvidos no programa para prepararem uma recomendação para a região.
- f) Uso de agrotóxicos: Em diversas propriedades, foi verificado que, a despeito da recomendação técnica, os produtores usam desnecessariamente uma série de agrotóxicos. Como mencionado acima, o assunto será abordado em palestra específica. Entretanto, durante a visita, fomos questionados sobre um problema específico: o potencial efeito do pH da água sobre a eficiência dos agrotóxicos. Alguns produtores levantaram esse problema tendo em vista a eventual ineficiência de alguns produtos no controle de pragas. Serão adquiridas fitas medidoras de pH, que serão enviadas ao Dr. Humberto para que ele realize ainda no mês de agosto um levantamento do pH da água utilizada por diferentes produtores na região. Na realidade, o pH da água pode inativar o agrotóxico, principalmente pH acima de 7, o que é comum na região. Após o levantamento, serão repassadas orientações

específicas sobre o procedimento adequado de ajuste de pH da água para maior eficiência dos agrotóxicos.

- g) Ponto de colheita do alho: Em algumas propriedades esta ocorrendo a colheita do alho ainda verde causando perdas de produtividade e reduzindo a conservação pós-colheita. A ausência de cura também foi observada, o que pode comprometer a qualidade e conservação durante a comercialização. Foi proposta ao técnico da EBDA a instalação de uma unidade para demonstrar o manejo correto da colheita e pós-colheita do alho no próximo ano.

Nos dias 21 e 22 de agosto, foi realizado em Cristópolis, BA, um encontro de produtores locais com os produtores de Boninal e Novo Horizonte, com a presença do Dr. Humberto da EBDA de Boninal, para discussão de um modelo de sistema de produção de alho para o município de Cristópolis. Os produtores de Boninal e Novo Horizonte foram convidados para que a experiência na melhoria de seu sistema de produção fosse levada aos produtores de Cristópolis. No dia 21 de agosto, houve uma reunião com produtores locais e técnicos da EBDA para discussão de uma proposta de um sistema de produção de alho. No dia 22 de agosto, foi realizada uma visita com produtores de alho de Boninal e Novo Horizonte às instalações de uma unidade de processamento de pasta de alho em Cristópolis, e uma visita à região produtora. Os produtores de Boninal e Novo Horizonte têm planejado a implantação de uma unidade de beneficiamento de alho e, nesse ponto, a experiência de Cristópolis é que foi repassada aos visitantes. As atividades dos dias 21 e 22 de agosto foram acompanhadas também pelo Dr. André Nepomuceno Dusi da Embrapa Hortaliças.

Em 22 de outubro, foram coletadas as informações de produção do alho livre de vírus em primeira e segunda exposições plantados em Novo Horizonte no ano de 2003. As parcelas foram plantadas em 28 de março e colhidas em 8 de agosto. A parcela de primeira exposição do Amarante livre de vírus, com 47 m², produziu 250 kg de alho verde, o que dá uma produtividade de 53 t/ha. Considerando uma quebra de 30% após a cura, devido à perda d'água, a produtividade estimada é de 37 t/ha. Para o alho no segundo ano de exposição em campo, em uma área de 120 m², foram colhidos 550 kg, o que dá uma produtividade de 46 t/ha de alho fresco, equivalente a 33 t/ha de alho curado. Para complementar as informações dessas unidades de observação, falta apenas realizar a análise do percentual de reinfecção viral. Por questões de fisiologia do alho, as análises só poderão ser realizadas em fevereiro de 2004, pois dependem da quebra de dormência dos bulbilhos para que os mesmos sejam plantados e as amostras de folhas então serem colhidas para análise.

Foram trazidos à Embrapa Hortaliças as parcelas dos experimentos 2 e 3 de competição de alho comum. O experimento 1 foi perdido devido a problemas na identificação das parcelas no momento de sua implantação. A análise estatística dos ensaios de competição de cultivares de alho comum dos experimentos 2 e 3 são apresentados na tabela 11.

5 – Atividades desenvolvidas em Boninal e Novo Horizonte em 2004

Parceiros: Embrapa Hortaliças, SEBRAE – BA, EBDA (Boninal/Novo Horizonte)

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Introdução de um sistema de produção próprio de alho-semente de alta qualidade sanitária e fisiológica para substituição da semente se alho semi-nobre atualmente utilizada: Foram implantadas duas unidades de multiplicação de alho-semente livre de vírus com os produtores Francisco Raimundo dos santos na comunidade do Cedro em Boninal e Nilson José Macedo no Brejo Luiza de Brito em Novo Horizonte. Essas unidades foram constituídas por um telado antiafídeos de 18 m² e 100 m² no campo. Foram obtidos 56 kg de alho semente no telado da Comunidade do Cedro e 35 kg no telado do brejo Luiza de Brito. No primeiro ano fora do telado obteve-se 12 kg e 325 kg de sementes, respectivamente, na Comunidade do Cedro e no Brejo Luiza de Brito. Na propriedade do Sr. Nilson foi plantada uma área de 3.560 m² a partir de alho-semente de um campo demonstrativo implantado em 2003. Nesta área foi obtida uma produção de 7.500 kg de alho-semente de alta qualidade. Este produtor já repassou cerca de 5.000 kg deste alho semente para outros produtores da região. Espera-se plantar 10 a 15 ha com esta semente em 2005, parte para uso comercial.

Promover adequação no manejo fitossanitário da cultura de forma a reduzir o número de aplicações de agrotóxicos atualmente adotado: devido ao atraso na liberação de recursos deste projeto, não foi possível viabilizar esta atividade. A EBDA foi contactada em dezembro, através de seu presidente, Dr. Joaquim Santana, para viabilizar no ano de 2005 um treinamento aos produtores por técnicos do Senar e da EBDA.

Elevar no mínimo em 30% a produtividade do alho semi-nobre plantado na região e promover um ganho na qualidade do alho semi-nobre da região para alcançar um maior valor de comercialização no mercado in natura: Foram implantadas unidades de observação para avaliação da cultivares Chinês Real, Gravatá, Lavínia, Hozan e Peruano. As produtividades obtidas na época da colheita com bulbos não curados

foram: Chinês Real = 48 t/ha, Gravatá = 48 t/ha; Hozan = 32 t/ha e Peruano = 40 t/ha. A cultivar Lavínia, não se desenvolveu adequadamente, provavelmente em função de ataque de pragas na semente antes do plantio. Pelos resultados obtidos pode-se concluir que as cultivares Chinês Real e Gravatá são boas opções de cultivares de alho comum para região. O alho Peruano em função do alto teor de sólidos totais e qualidade condimentar pode ser cultivar com objetivo de atender indústrias processadoras. A cultivar Hozan apresenta as mesmas qualidades do alho nobre produzido na região, com a vantagem de não necessitar de vernalização. Esta cultivar despertou interesse no produtores e técnicos locais com grande potencial de cultivo nesta região para atender o mercado de alho nobre.

Promover o uso racional de insumos como agrotóxicos, fertilizantes, água: o curso programado para ser dado aos extensionistas locais em novembro de 2004 foi adiado pela EBDA para fevereiro/março de 2005. A EBDA está alocando recursos para o custeio do curso e a Embrapa Hortaliças disponibilizará 16 h de aula in loco com seus técnicos.

Ampliar as opções de cultivares de alho nobre para cultivo na região. Foram montadas unidades de observação para avaliação da cultivares alternativa a Caçador, único material de alho nobre plantado na região. As produtividade obtidas na colheita com bulbos não curados foram: Roxo Caxiense = 32 t/ha, Caçador = 48 t/ha, Jonas = 60 t/ha, Quitéria = 32 t/ha, Blanco Galego = 40 t/ha e Chonan = 40 t/ha. A cultivar Jonas apresentou a maior produção dentre os materiais plantados, com potencial para aumentar a produtividade média do alho nobre na região de Boninal/Novo Horizonte. Estas cultivares serão novamente avaliadas na região em 2005.

Treinamento e transferência da tecnologia à EBDA e produtores locais: foi elaborado um comunicado técnico para orientação de técnicos e produtores sobre cultivo de alho em pequenas propriedades. Este comunicado abrange recomendações técnicas para o cultivo de alho nobre e comum baseado no sistemas de produção adotado na região de Boninal/novo Horizonte.

A introdução do conceito de produção de alho-semente com alta qualidade sanitária e fisiológica foi absorvida pelos produtores locais e pelo escritório da EBDA que promove a assistência técnica local. O impacto do primeiro ano de cultivo do material livre de vírus repassado pela Embrapa Hortaliças demandou para que no ano de 2004 o sistema completo fosse implantado em dois locais da região de Novo Horizonte - Boninal. Cada sistema completo incluiu um telado de 18 m² e uma área externa de 100 m² de alho livre de vírus, além da multiplicação dos materiais

produzidos no local em 2003. Com esta ação, um dos produtores já pode comercializar cerca de 5.000 kg de alho semente na região, a um preço superior ao produto de melhor qualidade produzido no local. Estima-se que para 2005 haverá uma área de 10 a 15 ha com a semente de alta qualidade, o que irá levar a uma auto-suficiência de semente sadia de alho comum em 2006. Foi possível também identificar outras opções de cultivares para consumo fresco de alho comum e nobre, e para processamento agro-industrial, em consonância com o projeto de construção de uma unidade de processamento de alho no Brejo Luiza de Brito.

A elaboração de uma circular técnica, que foi distribuída na região, possibilitou uma atualização no sistema de produção, principalmente na fixação da importância da qualidade da semente na implantação das lavouras

6 - Atividades desenvolvidas em Capelinha, MG em 2003

Parceiros: Embrapa Hortaliças, Apolônio Louback Filho (produtor).

Foram montadas duas unidades de validação da tecnologia de produção de alho semente livre de vírus na propriedade do produtor rural Apolônio Louback Filho em Capelinha, MG.

Capelinha situa-se na região do médio jequitinhonha/Mucuri, norte de Minas Gerais. O município apresenta temperatura média anual de 20,1°C, Altitude variando de 748 a 1244 m e índice pluviométrico de 1087 mm, apresentando, portanto, boas condições edafo-climáticas para cultura do alho.

O principal produto agrícola da região é o café, não havendo tradição no cultivo do alho. Entretanto, o município está estrategicamente localizado próximo a duas tradicionais regiões produtoras de alho em Minas Gerais, Gouveia e Francisco Sá, despertando interesse de alguns produtores em fornecer alho-semente livre de vírus para estas regiões.

Foram plantados aproximadamente 18.000 bulbilhos e 120.000 bulbilhos livres de vírus da cultivar Amarante, respectivamente, em áreas de 36 m² de telado e 200 m² no campo a céu aberto. Foi montado um campo de observação/demonstração para introdução na região da cultivar Hozan que é bastante produtiva e apresenta boa qualidade de bulbo.

O plantio foi realizado em 10/04/2003 e a colheita em 17/09/2003. Foram colhidos aproximadamente 80 kg de bulbos curados nos telados (2,2 kg/m²) e 400 kg de bulbos curados nas áreas de campo, obtendo-se produtividade de 15,0 t/ha. Na

unidade de observação/demonstração da cultivar Hozan obteve-se uma produtividade aproximada de 10,5 t/ha.

7 - Atividades desenvolvidas em Capelinha, MG em 2004

Parceiros: Embrapa Hortaliças, Apolônio Louback Filho (produtor).

Esta unidade foi iniciada em 2003 com dois telados e 200 m² de área de campo. Este ano foi implantada a segunda fase do sistema de produção de alho semente. Somando as áreas de telado e campo foi possível o plantio de aproximadamente 180 kg de alho-semente de alta qualidade numa área de aproximadamente 0,5 ha. Com esta área estima-se um plantio de aproximadamente 5 ha em 2005. O produtor pretende manter cerca de 2 a 3 ha de produção de alho-semente por safra, deverá começar a comercializar alho-semente de boa qualidade já para próxima safra. O plantio desta unidade foi feito entre os dias 3 a 5 de maio e colheita em setembro de 2004. Foram colhidos nesta unidade aproximadamente 3.500 kg de alho-semente de Amarante proveniente de material livre de vírus. Em 2005, parte deste material será comercializado como alho-semente e o restante será mantido pelo produtor que deverá manter uma área contínua de cerca de 2 a 3 ha por ano de produção de alho-semente livre de vírus.

8 – Atividades desenvolvidas em Gouveia, MG em 2003

Parceiros: Embrapa Hortaliças e EMATER – MG

Gouveia situada na região central de Minas Gerais, já foi uma das maiores regiões produtoras de alho daquele estado. Atualmente, esta cultura encontra-se em declínio, em função da baixíssimo nível tecnológico dos produtores e uso de sementes bastante degeneradas. Em 2002, o município produziu apenas 213 toneladas de alho em 71 ha, resultando numa produtividade de apenas 3 t/ha.

A EMATER – MG, através do escritório local de Gouveia solicitou apoio técnico da Embrapa Hortaliças para revitalização da cultura do alho na região. Para tentar solucionar a questão da degenerescência do alho-semente foi proposto inicialmente a instalação de unidades de observação com alho Amarante livre de vírus com produtores-chaves do município. Foi proposto também a avaliação da cultivar Hozan como alternativa ao material utilizado pelos produtores locais.

As unidades foram instaladas nas comunidades Cuiabá e Alpes, principais produtoras de alho de Gouveia. Os plantios foram realizados em 14/05/2003 e a colheita em 25/09/2003. Na comunidade Cuiabá foram instaladas unidades de 10 m² de

Amarante livre de vírus e Hozan e na comunidade Alpes 8,3 m² de Hozan e 9,7 m² de Amarante livre de vírus. Nestas unidades foram comparados também o sistema de manejo tradicional do produtor local (adubação orgânica localizada e plantio a lanço sem espaçamento definido) com o sistema proposto pela EMATER – MG (adubação orgânica + química incorporada em área total do canteiro e espaçamento 20 x 10 cm). Os dados das avaliações destas unidades ainda não foram enviados à Embrapa Hortaliças pelos técnicos da EMATER – MG.

Em função do grande interesse dos produtores locais pelo alho semente livre de vírus, será implantado em 2004, com apoio da prefeitura municipal o sistema de produção própria de alho semente livre de vírus. Esta unidade será instalada em área da prefeitura municipal de Gouveia com responsabilidade técnica da EMATER – MG que se responsabilizarão pela condução das unidades, multiplicação do alho-semente e posterior repasse aos produtores.

A unidade será iniciada com um telado (2.000 bulbilhos) e área de campo com 9.000 bulbilhos livres de vírus.

9 – Atividades desenvolvidas em Gouveia, MG em 2004

Parceiros: Embrapa Hortaliças e EMATER – MG

Em 2004 foi plantada uma unidade de multiplicação de alho-semente em um terreno cedido pela prefeitura municipal com um telado (2.000 bulbilhos) e área de campo com 9.000 bulbilhos livres de vírus. Foram plantados 261 m² de alho Amarante livre de vírus de primeira e segunda multiplicação em campo entre os dias 23 e 26/03/2004, usando uma adubação de 100 g/m² de NPK 04-30-16 + Zn e adubação de cobertura com 15 g/m² de 20-05-20.

Na mesma área da prefeitura foram multiplicados também 10 kg de semente da cultivar Hozan em uma área de 56,7 m², como unidade de observação/demonstração. O plantio foi feito nos dias 26 e 27/03/2004, usando uma adubação de 100 g/m² de NPK 04-30-16 + Zn e adubação de cobertura com 15 g/m² de 20-05-20. A cultivar Hozan apresenta características comerciais semelhantes aos alhos nobres, entretanto dispensa o choque frio em pré-plantio. Esta cultivar representa uma boa opção para pequenos produtores agregarem valor a sua produção.

Em duas propriedades foram multiplicados 10 kg de semente de Amarante LV com uma e com duas exposições em campo que funcionaram como unidades de observação/demonstração para outros produtores destas comunidades. Infelizmente essas unidades foram perdidas devido forte incidência de doenças foliares.

A prefeitura municipal e Emater estão se responsabilizando por todas as etapas de multiplicação do alho-semente e os produtores receberão o material apenas para realização dos plantio comerciais.

10 – Atividades desenvolvidas em Lavras e Itumirim em 2004

Parceiros: Embrapa Hortaliças, UFLA e EMATER – MG

Foram realizados experimentos com alho Amarante livre de vírus e Hozan na UFLA e unidades de demonstração da cultura do alho em Itumirim – MG. Atividades conjuntas da Embrapa Hortaliças/UFLA/EMATER – MG.

Na área experimental do setor de Olericultura da UFLA foram realizados experimentos para avaliação na região de Lavras das cultivares Amarante LV (1ª e 2ª exposição no campo) Hozan oriundos da Embrapa Hortaliças. Estas cultivares estão sendo avaliadas com outros materiais da coleção de germoplasma de alho da UFLA. Os experimentos foram implantados o final de abril. Estes experimentos estão sendo analisados na UFLA e os dados ainda não foram repassados à Embrapa Hortaliças.

Em Itumirim foram montadas unidades demonstrativas com as cultivares Chonan, Caçador e Gravatá oriundas da coleção de germoplasma de alho da UFLA e Amarante LV (2ª exposição) e Hozan da Embrapa Hortaliças. O plantio foi realizado entre 05/05 e 08/05 na Fazenda da Estância dos Srs Arlindo de Lima e Sebastião Darlei de Lima. A unidade foi implantada em uma área de aproximadamente 2.000 m², seguindo recomendações técnicas da Embrapa Hortaliças e Depto. Agricultura da UFLA, com acompanhamento técnico da Emater MG. As produtividades foram 6,5 t/ha, 11,8 t/ha, 7,8 t/ha e 8.7 t/ha para Gravatá, Amarante LV, Caçador e Chonan, Respectivamente.

11 – Atividades desenvolvidas em Inconfidentes (MG) em 2004

Parceiros: Embrapa Hortaliças e Escola Agrotécnica Federal de Inconfidentes (Eafi)

Foi montada uma unidade de demonstração da tecnologia do alho semente de alta qualidade com alho Amarante livre de vírus e uma unidade de observação com a cv. Hozan.

12 – Atividades desenvolvidas em Guarapuava (PR) em 2004

Parceiros: Embrapa Hortaliças e Unicentro

Foi montada uma unidade de demonstração da tecnologia de vernalização de alho nobre das cv. Caçador e Quitéria.

13 – Atividades desenvolvidas em Seropédica, Paty do Alferes, Petrópolis e Nova Friburgo (RJ) em 2004

Parceiros: Embrapa Hortaliças e Embrapa Agrobiologia

Foi montada uma unidade de demonstração da tecnologia do alho semente de alta qualidade com alho Amarante livre de vírus na Seropédica. Em Paty do Alferes foi montada uma unidade de demonstração da cultura do alho. Em Petrópolis e Nova Friburgo foram montadas unidades de demonstração da cultura do alho orgânico, onde incluiu-se o alho cv. Amarante livre de vírus.

A tabela 12 apresenta a relação completa de unidades de validação e demonstração montadas em 2005.

Publicações

RESENDE, F.V.; TORRES, A.C.; BUSO, J.A.; ORILIO, A.F.; DUSI, A.N. Avaliação de um sistema de produção própria de alho-semente de alta qualidade sanitária e fisiológica por pequenos produtores de Bahia. *Horticultura Brasileira*, v.22, n.2, julho, 2004. Suplemento 2. CD-ROM.

RESENDE, F.V.; DUSI, A.N.; MELO, W.F. de. Recomendações básicas para produção de alho em pequenas propriedades. Brasília: EMBRAPA-CNPH, 2004. 12p. (EMBRAPA-CNPH. Comunicado Técnico da Embrapa Hortaliças, 22).

RESENDE, F.V. Alho: grande mercado. *Cultivar Hortaliças e frutas*. V.28, outubro de 2004. 6p. (encarte especial).

Jornal A TARDE, Salvador, BA. Ano 91, n.31.092, p. 4-5, 24/05/2004. Reportagem no suplemento rural sobre as ações da Embrapa Hortaliças com alho livre de vírus e alho nobre na região de Cristópolis, BA.

Patentes

Não houve

Tecnologia, Serviços e Produtos

Não houve

Transferência de Tecnologia e de Conhecimentos

- Dia de Campo na TV: Produção de alho semente de alta qualidade. 01/10/2004, 9:00 –10:00 hs. Explica a obtenção do alho semente livre de vírus e como este material de alta qualidade fitossanitária e fisiológica deve ser produzido na propriedade do agricultor, que em quatro anos poderá substituir toda sua semente tradicional. O Dia de Campo na TV foi transmitido ao vivo do estúdio da Embrapa Informação Tecnológica, em Brasília, para todo o país, via satélite.
- Dia de campo: Cultura do Alho. 27/08/2004. 12:00 – 15:00 hs Fazenda Estância, Itumirim – MG. Realizado com pela Embrapa Hortaliças com a colaboração da Emater – MG e Universidade Federal de Lavras. Teve como objetivo apresentar informações sobre cultivares, produção de alho-semente, sistema de produção e colheita e beneficiamento do alho para pequenos produtores de leite e milho desta região interessados em diversificar suas atividades.
- Dia de campo: Cultivo de mandioquinha salsa e produção de alho-semente. 25/08/2004. 8:00 – 12:00 hs. Sede da prefeitura municipal, Gouveia – MG. Realizado com pela Embrapa Hortaliças com a colaboração da Emater – MG. Teve como objetivo demonstrar aspectos de produção da mandioquinha-salsa e apresentar os resultados da unidade de validação de produção de alho-semente livre de vírus para os produtores de alho daquela região.

Planejado/Realizado

Em 2002 foram instaladas cinco das sete unidades de observação/demonstração propostas e duas das cinco unidades (Cristópolis e Jacobina) pilotos de multiplicação de alho semente livre de vírus. Em 2003 foram implantadas sete unidades pilotos de multiplicação de alho semente livre de vírus, cinco em Cristópolis e duas em Capelinha. Em 2004 foram realizadas 10 unidades: cinco em Cristópolis, duas em Capelinha, duas em Boninal/Novo Horizonte e uma em Gouveia, ou seja, cinco unidades além do que foi previsto no projeto inicial. A partir de 2003 foram incorporadas ao projeto as atividades do convênio com Sebrae: Introdução de alho nobre em Cristópolis, e alho comum para processamento em Boninal/Novo Horizonte.

Equipe Técnica

Francisco Vilela Resende, responsável, 20%

André Nepomuceno Dusi, membro, 15% → 225 97
Antonio Carlos Torres, membro, 3% → 225 97
Dione Melo da Silva, membro, 1% → 297 673
José Amauri Buso, membro, 5% → 1095 673
Ildeu Ferreira de Sousa, colaborador, 1% →
Florício Pinto de Almeida, colaborador 1%
Pedro Venício Lopes, colaborador 50% →
Rovilson José de Souza, colaborador 5% → 225 97 (82)
Márcio Edgar Rodrigues Leite, colaborador 5% →
Ewerton Giovanni dos Santos, colaborador 10% →
Apolônio Louback Filho, colaborador 10%
Werito Melo, 5%

Avaliação Global do Andamento

Projeto concluído com alcance de metas superando o previsto.

Situação Geral do Subprojeto

Avaliação do responsável: concluído

Avaliação do líder (quantitativa): 10

Anexos

Tabela 1. Médias de taxa de Multiplicação, Produção de bulbos e peso médio de bulbos de unidades de observação de alho livre de vírus em cultivo orgânico. Plantio, abril de 2002.

Cultivares	Rajadinha (Planaltina)			Lamarão (PAD-DF)			
	Tx. Multiplic. (dentes/bulbo)	Prod. Total (t/ha)	Peso Médio bulbo (g)	Tx. Multiplic. (dentes/bulbo)	Prod. Total (t/ha)	Peso Médio bulbo (g)	
Amarante LV	23,1	18,5	36,0	11,4	9,0	18,0	
Amarante CV	15,0	12,4	24,8	9,7	7,0	14,0	
Hozan	12,6	12,8	25,6	11,5	7,0	14,0	

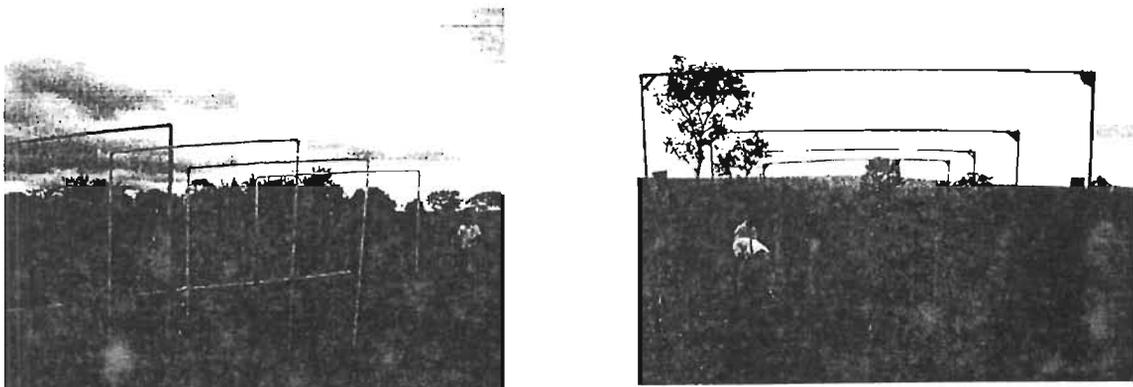


Figura 1. Detalhe da nova estrutura proposta de tubos de ferro galvanizado (esquerda) e metalon (direita)

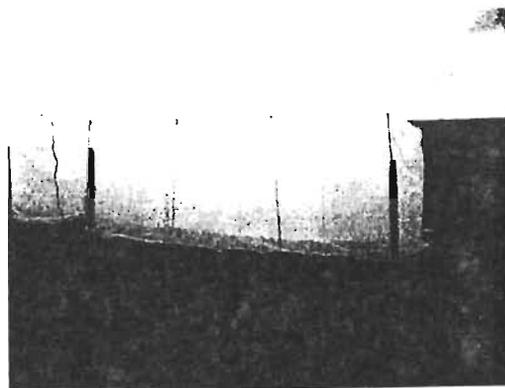


Figura 2. Telado montado



Figura 3. Instalação e condução dos telados em Cristópolis – BA, 2003

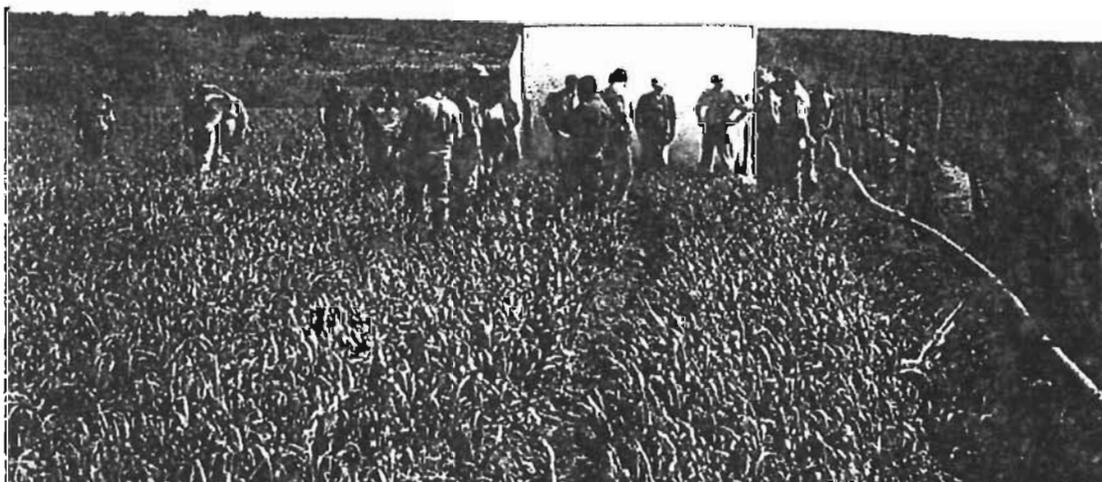


Figura 4. Dia de campo com produtores de alho de Cristópolis – BA, 2003

Tabela 2. Médias do Estande Final, peso médio de bulbo e rendimento de cultivares de alho nobre avaliadas em Cristópolis – Bahia, 2003.

Cultivares	Estande Final (plantas/parcela)	Peso médio Bulbo (g)	Rendimento (kg/ha)
Chonan	39,50 b	8,68 b	1889 c
Caçador	39,75 b	10,49 b	2292 c
Quitéria	36,25 b	14,62 a	2907 b
Jonas	28,75 b	11,33 b	1871 c
DDR-6024	38,50 b	13,32 a	2792 b
DDR-6804	49,25 a	11,14 b	3049 b
DDR-6807	49,50 a	10,85 b	3000 b
RE-6811	53,00 a	12,31 b	3590 a
RE-518-1	49,75 a	15,87 a	4292 a
RAL-41	50,50 a	10,41 b	2944 b

Tamanho da parcela: 1,8 m², espaçamento: 10 cm entre plantas x 30 cm entre linhas.
Médias comparadas pelo teste Scott-knott com 5% de probabilidade.



Figura 5. Experimento com cultivares de alho nobre e unidade de observação com a cultivar Caçador e irrigação por microaspersão, Cristópolis – BA, 2003



Figura 6. Unidade de validação de alho semente livre de vírus e instalação de experimentos de alho comum e nobre e unidade de observação de Caçador, Cristópolis – BA, 2004.

Tabela 3. Médias do peso de planta (folhas+bulbos+raízes), em gramas.m⁻², e número de plantas colhidas (EF) de alho do produtor e oriundos de alho semente livres de vírus em 1^a (1) e 2^a (2) exposição ao campo nas unidades de validação de Cristópolis - BA. (o peso registrado refere-se ao peso antes da cura apropriada. Novas avaliações serão realizadas por ocasião do plantio no próximo ano, quando a cura estará uniforme entre as unidades). 2003

Tipos de alho semente	UV 01		UV 02		UV 03		UV 04		UV 05	
	Peso	EF	Peso	EF	Peso	EF	Peso	EF	Peso	EF
Produtor	1753,2	65	297,0	34	769,0	41	941,0	40	-	-
Livre Vírus - 1	1888,6	66	261,0	38	1231,2	51	1749,2	47	-	-
Livre Vírus – 2	-	-	558,2	48	1507,6	56	-	-	-	-

UV 01: José Borges de Brito; UV 02: Valcy Xavier de Lima; UV 03: Adécio Messias Brandão; UV 04: Gerulino Rodrigo de Souza; UV 05: Idelfonso Câmara

Tabela 4. Número de réstias colhidas (50 bulbos/réstia) nas unidades de validação de alho semente livre de vírus em Cristópolis – BA, 2003. (Obs: a UV 03 irá nos enviar os dados)

Tipos de alho semente	UV 01	UV 02	UV 03	UV 04	UV 05
Telados	16	14	-	10	14
Livre Vírus – 1	124	25	-	109	55
Livre Vírus – 2	-	290	-	-	-

UV 01: José Borges de Brito; UV 02: Valcy Xavier de Lima; UV 03: Adécio Messias Brandão; UV 04: Gerulino Rodrigo de Souza; UV 05: Idelfonso Câmara

Tabela 5 – Resultado final da unidade de validação de alho-semente livre de vírus, produtor José Borges de Brito (Cristópolis – BA, 2004).

	Alho tipo 07	Alho tipo 06	Alho tipo 05	Alho tipo 04	Alho tipo 03	Refugo	Produção total (t/ha)	Peso médio bulbo (g)	Estande final (plantas/ha)
ALV 1 ANO (%)		1,10 (8,2)	6,16 (50,7)	4,00 (31,9)	0,70 (5,8)	0,14 (3,2)	12,16 A*	31,02	392.000
ALV 2 ANO (%)	0,10 (1,0)	0,76 (7,0)	6,27 (56,8)	3,07 (27,8)	0,65 (5,9)	0,13 (1,2)	11,05 AB	29,39	376.000
AC Selec. (%)		0,11 (1,3)	3,88 (45,6)	3,06 (35,9)	0,60 (7,1)	0,84 (9,9)	8,53 B	26,67	320.000
A COMUM (%)		0,19 (3,2)	2,00 (32,5)	2,35 (38,1)	0,96 (15,6)	0,64 (10,4)	6,17 C	22,04	280.000

Teste t student ou Mann-Whitney (5%)

Tabela 6 – Resultado final da unidade de validação de alho-semente livre de vírus, produtor Adécio Messias Brandão (Cristópolis – BA, 2004).

	Alho tipo 07	Alho tipo 06	Alho tipo 05	Alho tipo 04	Alho tipo 03	Refugo	Produção total (t/ha)	Peso médio Bulbo (g)	Estande final (plantas/ha)
ALV 1 ANO (%)			2,59 (26,2)	4,74 (47,8)	1,80 (18,3)	0,74 (7,5)	9,90 A*	24,28	408.000
ALV 2 ANO (%)			3,21 (33,0)	4,33 (44,4)	1,55 (15,9)	0,62 (6,5)	9,73 A	24,34	400.000
ALV 3 ANO (%)			3,81 (33,7)	4,90 (43,3)	1,82 (16,1)	0,75 (6,7)	11,30 A	24,78	456.000
A. COMUM							1,57 B	4,48	352.000
TELADO (%)	0,21 (7,2)	1,56 (50,7)	0,93 (30,6)	0,19 (6,6)	0,13 (4,6)		3,08	6,88	448.000

Teste t student ou Mann-Whitney (5%)

Tabela 7 – Resultado final da unidade de validação de alho-semente livre de vírus, produtor Gerolino Rodrigo de Souza (Cristópolis – BA, 2004).

	Alho tipo 07	Alho tipo 06	Alho tipo 05	Alho tipo 04	Alho tipo 03	Refugo	Produção total (t/ha)	Peso médio Bulbo (g)	Estande final (plantas/ha)
ALV 1 ANO (%)			0,58 (6,7)	2,75 (31,6)	2,75 (31,6)	2,60 (29,9)	8,70 ^{A*}	16,24	536.000
A COMUM (%)			0,21 (4,3)	1,24 (24,9)	1,40 (28,0)	2,13 (42,6)	5,01 B	11,61	432.000

Teste t student ou Mann-Whitney (5%)

Tabela 8 – Resultado final da unidade de validação de alho-semente livre de vírus, produtor Valcy Xavier de Lima (Cristópolis – BA, 2004).

	Alho tipo 07	Alho tipo 06	Alho tipo 05	Alho tipo 04	Alho tipo 03	Refugo	Produção total (t/ha)	Peso médio Bulbo (g)	Estand final (plantas/ha)
ALV 1 ANO (%)			0,90 (13,2)	3,20 (47,0)	1,18 (17,4)	1,50 (22,2)	6,81 B*	18,50	368.000
ALV 2 ANO (%)			0,85 (10,9)	2,65 (33,7)	2,94 (37,6)	1,38 (17,6)	7,86 A	20,00	392.000
A. COMUM							3,89 C	15,50	252.000
TELADO			0,88 (32,7)	1,01 (37,8)	0,37 (14,0)	0,41 (15,4)	2,69	5,35	504.000

Teste t student ou Mann-Whitney (5%)

Tabela 9 – Resultado final do experimento com cultivares de alho nobre (Cristópolis – BA, 2004).

CULTIVARES	PRODUÇÃO (g/parcela)	PRODUÇÃO (t/ha)
04 – Jonas	793.77	3,52 A
02 – Caçador	458.95	2,03 B
01 – Chonan	365.45	1,62 C
03 – Quitéria	213.80	0,95 C
09 – R. Caxiense	169.12	0,75 C
07 – RE 6811	141.40	0,62 C
06 – WE 8410 BG	85.67	0,38 C
05 – DDR-6024*	-	-
08 – RE 518-1*	-	-
10 – RE 493099*	-	-

* Não houve a formação de bulbos.

Tamanho da parcela: 1,2 x 1,5 m (1,8 m²)

** Scott & Knott, 5%

Tabela 10 – Resultado final do experimento com cultivares de alho comum (Cristópolis – BA, 2004)

CULTIVARES	PRODUÇÃO (g/parcela)	PRODUÇÃO (t/ha)
02 – G. Lavinia.	670.80	3,57 A
05 – Chinês Real	651.67	3,47 A

08 – Caturra	577.10	3,07 A
10 – G. Roxo.	569.85	3,03 A
03 – G. Roxão.	561.85	2,92 A
07 – Hozan	555.32	2,96 A
09 – Cateto Roxo	551.40	2,57 A
04 – Gravatá	546.40	2,94 A
01 – Amaranite	518.30	2,76 A
06 – C.S. Joaquim	403.17	2,15 A

Tamanho da parcela: 1,5 x 1,0 m (1,5 m²)

* Não houve diferença estatística entre os tratamentos (Scott & Knott, 5%)



Figura 7. Plantio de alho com semente livre de vírus (a) em contraste com o alho comum (b), plantados na mesma época, cerca de 40 dias após o plantio. Na foto, Dr. Francisco (de boné) e Dr. Humberto.

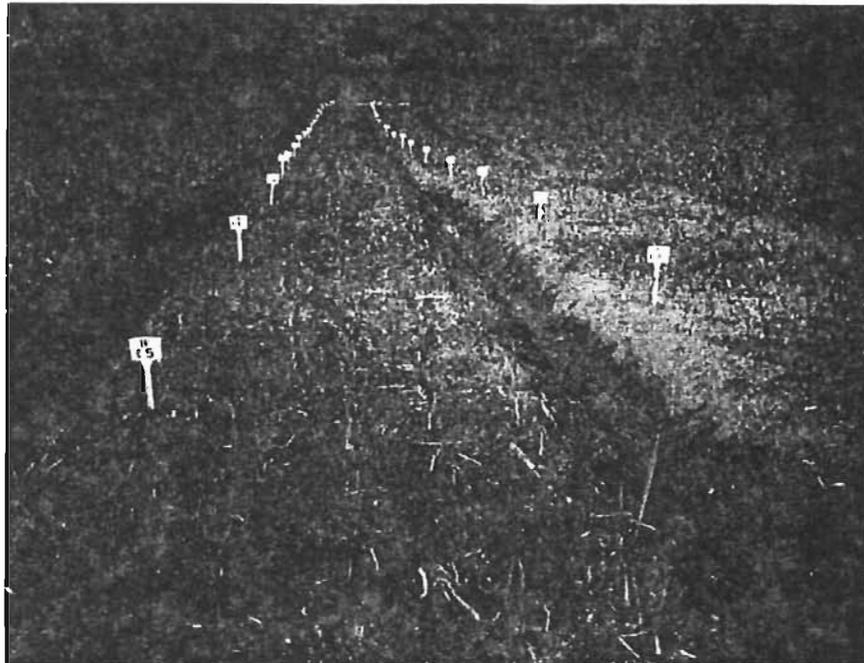


Figura 8. Vista do ensaio de competição de cultivares de alho comum aos 15 dias após o plantio.



Figura 9. Alho livre de vírus (a) e comum (b) aos cerca de 90 dias após o plantio



Figura 10. Altura das plantas de alho livres de vírus, aos cerca de 90 dias após o plantio. Segurando as plantas, o Dr. André, tendo ao fundo o Dr. Humberto.



Figura 11. Planta originária de alho livre de vírus (direita) e planta originária de semente comum (esquerda). Na foto, Dr. Humberto.

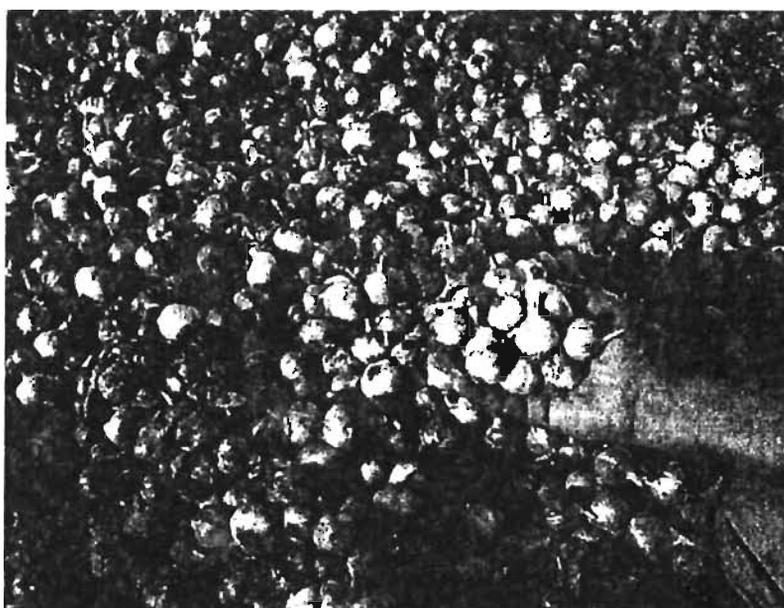


Figura 12. Produção do alho com amarelão. Notar o pequeno tamanho dos bulbos em relação à mão que os segura.

Tabela 11. Experimentos com cultivares de alho comum na região de Boninal – BA, 2003

Cultivares	Experimento 2 Plantio: 08/05/2003			Experimento 3 Plantio: 19/05/2003		
	Produtiv. (t/ha)	P.M. bulbo (g)	> classe 2 (%)	Produtiv. (t/ha)	P.M. bulbo (g)	> classe 2 (%)
Amarante L.V.	10,0 a	19,4 a	84,2	9,5 a	22,2 a	93,6
Caturra	2,9 b	6,6 c	30,0	3,9 c	9,8 c	52,5
B. Mineiro	4,9 b	11,3 b	62,9	3,5 c	9,2 c	68,0
Chinês Real	4,1 b	10,4 b	49,4	5,1 c	12,7 b	64,5
Chinês S.J.	4,7 b	10,6 b	54,6	3,6 c	10,0 c	53,6
Peruano	3,9 b	10,8 b	41,0	2,8 c	8,7 c	41,6
Hozan	4,3 b	11,3 b	68,1	2,8 c	8,6 c	40,7
Gravatá	5,0 b	10,6 b	49,0	6,3 b	12,6 b	67,5
G. Lavínia	4,7 b	11,8 b	68,0	4,4 c	11,8 b	59,6
G. Roxão	3,5 b	8,5 c	45,7	4,0 c	10,6 c	56,7

Scott & Knott (5%)

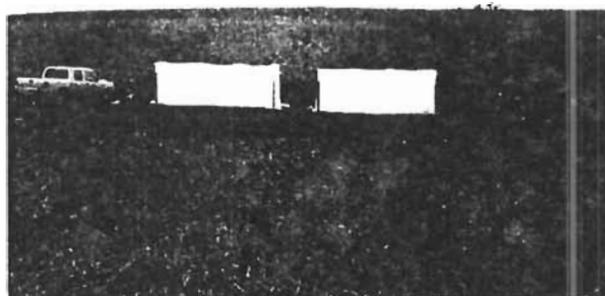
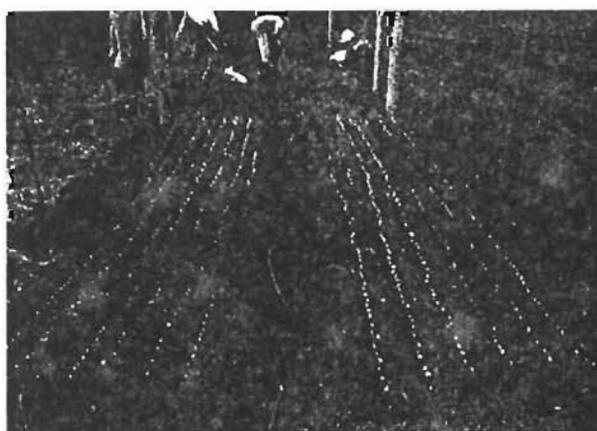


Figura 13. Instalação dos telados e plantio do alho livre de vírus em Capelinha - MG

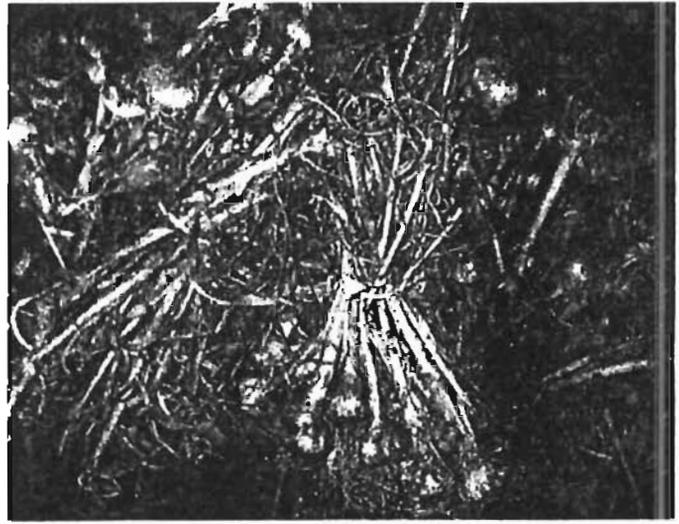
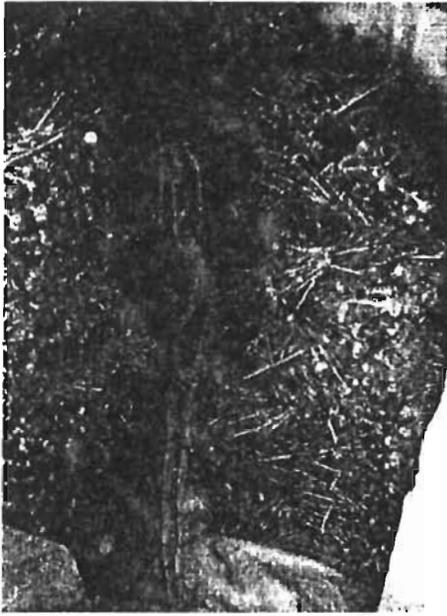


Figura 14. Alho-semente de Amaranthe originário de bulbilhos livres de vírus produzido em Capelinha – MG, 2003.

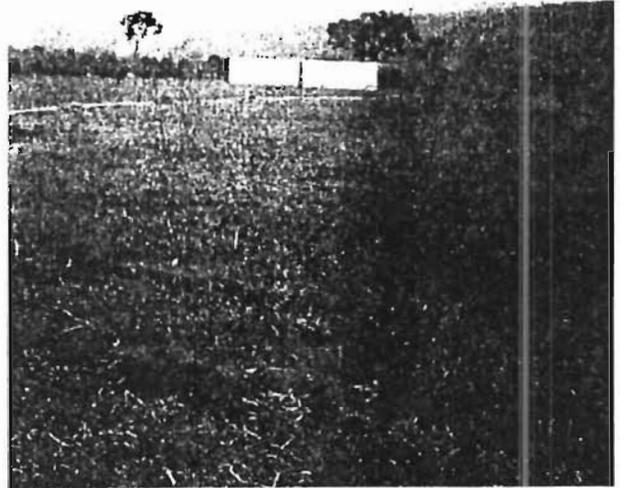
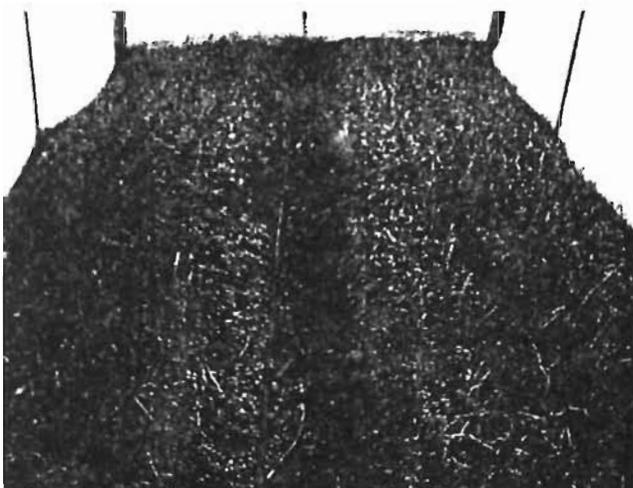


Figura 15. Telado e campo de produção de alho-semente livre de vírus em Capelinha-MG, 2004



Figura 16. Unidade de validação de produção de alho-semente livre de vírus em Gouveia-MG, 2004



Figura 17. Unidade de observação da cultivar Hozan em Gouveia-MG, 2004

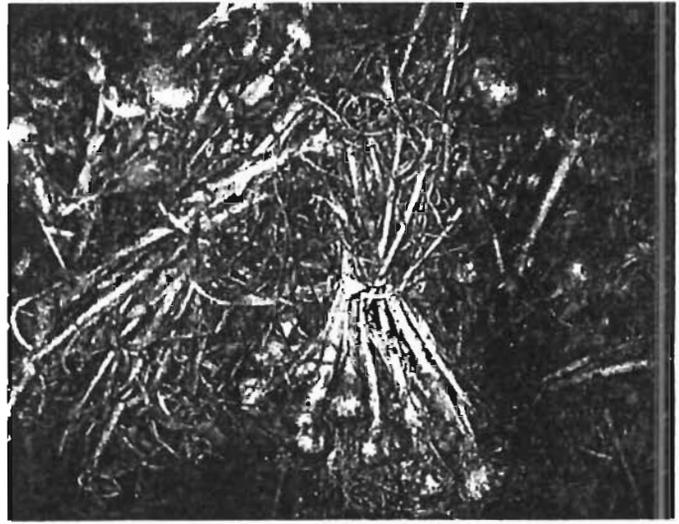


Figura 14. Alho-semente de Amarante originário de bulbilhos livres de vírus produzido em Capelinha – MG, 2003.

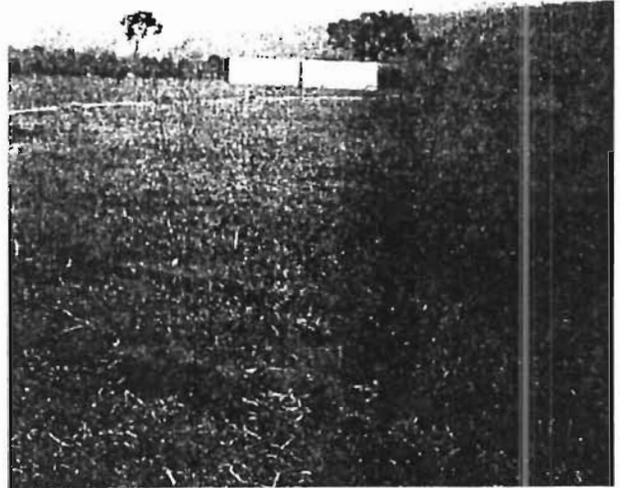
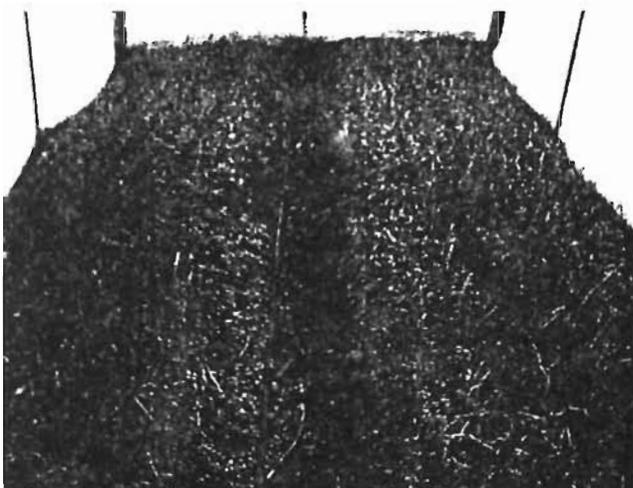


Figura 15. Telado e campo de produção de alho-semente livre de vírus em Capelinha-MG, 2004



Figura 18. Unidades de observação de alho Amarante livre de vírus e Hozan em Gouveia – MG, 2003.



Figura 19. Dias de campo em Gouveia e Itumirim –MG, 2004

Tabela 12. Unidades de validação e demonstração estabelecidas em 2004.

UF	Município	Tipo	Nº Un.	Parceiro
BA	Cristópolis	UV alho livre de vírus	4	EBDA e Prefeitura
BA	Cristópolis	UD alho nobre	1	EBDA e Prefeitura
BA	Cristópolis	UD irrigação por microaspersão	1	EBDA e Prefeitura
BA	Cristópolis	UD alho comum, 10 cv.	1	EBDA e Prefeitura
BA	Boninal	UV alho livre de vírus	1	EBDA
BA	Boninal	UO alho comum para processamento	1	EBDA
BA	Boninal	UO alho nobre	1	EBDA
BA	Novo Horizonte	UV alho livre de vírus	1	EBDA
MG	Capelinha	UV alho livre de vírus	1	Produtor privado
MG	Gouveia	UV alho livre de vírus	1	Emater e Prefeitura
MG	Gouveia	UO alho Hozan	1	Emater e Prefeitura
MG	Itumirim	UO alho livre de vírus e comum	1	Emater
MG	Itumirim	UO alho nobre	1	Emater
MG	Inconfidentes	UO alho livre de vírus	1	Eafi
MG	Inconfidentes	UO alho Hozan	1	Eafi
MG	Lavras	UO alho Hozan	1	Ufla
MG	Lavras	UO alho livre de vírus	1	Ufla
PR	Guarapuava	UD vernalização de alho nobre	1	Unicentro
RJ	Seropédica	UD alho livre de vírus	1	Embrapa Agrobiologia e Pesagro
RJ	Paty do Alferes	UD da cultura do alho	1	Embrapa Agrobiologia
RJ	Petrópolis	UD da cultura do alho orgânico	2	Embrapa Agrobiologia
RJ	Nova Friburgo	UD da cultura do alho orgânico	1	Embrapa Agrobiologia e Pesagro