

1 **Regeneração de plantas de alho *in vitro* após o cultivo de ápices** 2 **caulinares**

3 **Diego Apelfeler¹; Fernanda Rausch Fernandes²;**

4 ¹Faculdade Anhanguera de Brasília, 71950-550 Taguatinga/DF. ²Embrapa Hortaliças. BR 060, Km 09,
5 70359-970 C.P. 218 Brasília – DF; diego_kawaii@aedu.com, fernanda@cnph.embrapa.br.

7 **RESUMO**

8 Foram avaliados o potencial de regeneração de genótipos de alho (Gigante de Lavínia,
9 San Valentim, Ito, Caçador, Chinês Real, Cattura, Jonas, Gravatá, Peruano, Roxo
10 Caxiense, Amarante, Gigante do Núcleo, Bergamota, Hozan, RAL 41, RE518.1 e
11 Ribeiro) após a termoterapia e o cultivo de ápices caulinares, procedimentos que
12 compõem a limpeza clonal do alho. Foi realizado o procedimento de limpeza clonal
13 adotado pelo Laboratório de Biologia Celular da Embrapa Hortaliças, e avaliada a taxa
14 de regeneração, para posterior indexação viral das plantas regeneradas. Percebe-se que
15 existe diferença nítida entre as cultivares quanto à taxa de regeneração, possivelmente
16 em função de uma diferença de sensibilidade quanto à termoterapia e/ou ao cultivo dos
17 ápices caulinares.

18 **PALAVRAS-CHAVE:** *Allium sativum* L., vírus, cultura de tecidos.

19 **ABSTRACT**

20 We evaluated the potential for regeneration of garlic genotypes (Gigante de Lavínia,
21 San Valentim, Ito, Caçador, Chinês Real, Cattura, Jonas, Gravatá, Peruano, Roxo
22 Caxiense, Amarante, Gigante do Núcleo, Bergamota, Hozan, RAL 41, RE518.1 e
23 Ribeiro) after thermotherapy and shoot tip culture,
24 procedures of clonal cleaning of garlic. We carried out the cleaning procedure adopted
25 by the Cell Biology Laboratory at Embrapa Vegetables, and evaluated the regeneration
26 rate for subsequent viral indexing of regenerated plants. It can be seen that there is clear
27 difference between cultivars in regeneration rate, possibly due to a difference in
28 sensitivity to the thermotherapy and / or the cultivation of the stem apex.

29 **Keywords:** *Allium sativum* L., virus, tissue culture.

30 **INTRODUÇÃO**

31 O alho é hospedeiro natural de espécies virais pertencentes aos gêneros *Potyvirus*,
32 *Carlavirus* e *Allexivirus*, que têm sido detectadas em plantas de alho nas principais
33 regiões produtoras em todo o mundo (Barg et al., 1994; Lunello et al., 2007; Dovas et
34 al., 2001; Fajardo et al., 2001; Conci et al., 2002; Koo et al., 2002; Chen et al., 2004;

35 Melo Filho et al., 2004; Takaki et al., 2005; Melo Filho et al., 2006; Shahraeen et al.,
36 2008; Karlova et al., 2009; Smekalova et al., 2010). Os vírus são disseminados e
37 perpetuados em plantios sucessivos, acarretando degenerescência, uma vez que as
38 cultivares de alho plantadas no Brasil e em vários países do mundo, estão infectadas por
39 um ou mais vírus (Carvalho, 1986; Conci et al., 1992; Barg et al., 1994; Tsuneyoshi et
40 al., 1998; Fajardo et al., 2001; Takaichi et al., 2001; Mituti et al., 2011). As infecções
41 causadas por vírus são difíceis de serem evitadas devido à transmissão via vetores e pela
42 eficiente transmissão via alho-semente contaminado. A obtenção de alho livre de vírus é
43 de extrema importância e a metodologia mais comumente utilizada é a cultura de
44 meristemas, acompanhada ou não pela termoterapia (Walkey et al., 1987; Torres et al.,
45 2000). Um fator da limpeza viral que pode ser otimizado é a termoterapia, avaliando-se
46 a adaptação de melhores condições de temperatura e fonte de calor ao cultivo de ápices
47 caulinares para as cultivares que necessitam desse tratamento prévio. Conci et al. (2005)
48 verificaram comportamento diferencial de 11 cultivares submetidas ou não à
49 termoterapia previamente ao cultivo “in vitro”. Verificou-se que a termoterapia
50 promoveu incremento no número de plantas livres de vírus para algumas cultivares,
51 enquanto que, para outras não havia diferença entre realizar ou não esse tratamento
52 prévio. Isso demonstra a importância de se estabelecer uma metodologia adaptada para
53 as cultivares em estudo. Foi verificada também a taxa de eliminação de representantes
54 dos três gêneros de vírus, sendo que os *Potyvirus* e *Carlavirus* foram mais facilmente
55 eliminados nas cultivares testadas. Em se tratando dos *Allexivirus*, houve reação
56 diferencial entre as cultivares e as espécies virais. Outras modalidades de erradicação de
57 vírus de material vegetal têm sido estudadas. A crioterapia tem se mostrado uma técnica
58 eficiente na limpeza clonal de fitopatógenos e já foi testada para várias espécies vegetais
59 (Wang et al., 2008a, 2008b, 2009).

60 Sabe-se que a utilização de alho-semente de elevada qualidade fitossanitária é a
61 tecnologia que pode proporcionar maiores rendimentos e a garantia de obtenção de um
62 produto de melhor qualidade a ser oferecido no mercado. Analisando plantios de alho
63 livre de vírus durante três anos consecutivos, Tanabe (1999) verificou, ao final do
64 terceiro ano, que 47% das plantas originalmente livres de vírus estavam infectadas e
65 apresentaram uma queda de 27% na produção. Entretanto, essa queda foi irrelevante
66 quando comparada às plantas provenientes de sementes utilizadas pelo produtor. Ao

67 final dos três anos de exposição em campo, as plantas de alho-semente livre de vírus
68 apresentaram um aumento de produção de 100%, quando comparadas às plantas
69 originadas de alho-semente utilizado pelo produtor. Na Argentina, Conci et al. (2003)
70 verificaram um aumento de 66 a 216% na massa de bulbos de plantas livres de vírus em
71 relação às plantas infectadas no primeiro ciclo de cultivo e, ainda no quinto ciclo, foi
72 observado aumento de 33%. Em outro estudo na Argentina, Perotto et al. (2010)
73 avaliaram o efeito de infecções virais adicionais em cultivo de alho livre de vírus, alho
74 infectado pelo GarV-A, alho infectado pelo GarV-C e alho infectado por uma mistura
75 de vírus que naturalmente infectam a cultura, sendo que a avaliação foi realizada
76 durante quatro estações de cultivo. Os autores verificaram que a produtividade do alho
77 reduziu mais rapidamente em plantas infectadas com pelo menos um allexivírus e com a
78 mistura de vírus do que as plantas que eram inicialmente livres de vírus. No Brasil,
79 Melo Filho et al. (2006) conduziram um estudo durante sete anos consecutivos com o
80 objetivo de verificar a degenerescência relacionada à reinfecção no cultivo de alho,
81 registrou um aumento de 141% da produção em plantas livres de vírus em relação às
82 infectadas pelo complexo viral no primeiro ciclo, enquanto que, no quinto ciclo, ainda
83 foi registrado um aumento de 49%. Até na sétima geração de plantio, em condições
84 experimentais com alta pressão de inóculo, a produção foi cerca de 30% maior que
85 aquela obtida com o alho utilizado comumente pelo produtor (Melo Filho et al., 2006).
86 A melhoria no sistema de obtenção de alho de alta qualidade fitossanitária é um esforço
87 com elevado mérito, haja visto que o insumo obtido é o maior fator contributivo à
88 elevação da competitividade do produtor nacional e fortalecimento da cadeia produtiva.
89 O presente trabalho teve o objetivo de avaliar o potencial de regeneração de plantas de
90 alho a partir do cultivo de ápices caulinares submetidos previamente ao tratamento
91 termoterápico para diferentes cultivares de alho.

92 **MATERIAIS E MÉTODOS**

93 Foram obtidos bulbilhos (utilizados como fonte de explante) dos genótipos Gigante de
94 Lavínia, San Valentim, Ito, Caçador, Chinês Real, Cattura, Jonas, Gravatá, Peruano,
95 Roxo Caxiense, Amarante, Gigante do Núcleo, Bergamota, Hozan, RAL 41, RE518.1 e
96 Ribeiro e estes colocados em câmara fria a 4°C, de modo a atingirem o índice visual de
97 superação de dormência (IVSD de 80%). Estes foram previamente selecionados por
98 tamanho, de modo a homogeneizar o desenvolvimento in vitro. Assim que foram

99 retirados da câmara fria, foram colocados em bandejas e mantidos em estufa a 37°C, por
100 um período de 30 a 44 dias. Finalizado o período de termoterapia, os bulbilhos foram
101 seccionados transversal e longitudinalmente para a eliminação das folhas protetoras.
102 Procedeu-se a desinfestação dos ápices (10 a 20 mm de tamanho) com solução de
103 hipoclorito de sódio 0,5% (20 minutos) e, em seguida, lavados em água destilada e
104 autoclavada. Os explantes foram excisados em capela de fluxo laminar (em condições
105 assépticas) e consistiram do meristema apical com um primórdio foliar e porção
106 subadjacente do caule. Estes foram inoculados em meio de cultura básico para
107 diferenciação de parte aérea (MS; 3% sacarose; 0,2% de gelrite e, em mg.L⁻¹: i-inositol,
108 100; glicina, 2,0%; tiamina.HCl, 1,0; piridoxina.HCl, 0,5; ácido nicotínico, 0,5;
109 isopenteniladenina, 0,1 e ácido indolbutírico, 0,1) distribuído em tubos de ensaio
110 fechados com tampas de propileno e autoclavados. Os explantes excisados em capela de
111 fluxo laminar foram colocados individualmente nos tubos contendo o meio e estes
112 foram mantidos em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura
113 de 25±2°C. A partir do dia em que os explantes foram inoculados foi observada a
114 freqüência de regeneração de plantas de alho.

115 **RESULTADOS**

116 Foram cultivados um total de 1007 ápices caulinares após o tratamento termoterápico,
117 dentre esses 13% da cv. Gigante do Núcleo, 14% da cv. Ribeiro; 9,53% do acesso
118 RE518.1, 6,65% do acesso RAL 41, 10,33% da cv. Caturra, 13,80% da cv. Chinês Real,
119 18,37% da cv. San Valentin e 14,3% da cv. Caçador. Esses números dependeram da
120 disponibilidade de bulbos de cada acesso usados como fontes de explantes.

121 Percebe-se grande variação entre as cultivares em termos de percentual de regeneração
122 após o tratamento termoterápico (Tabela 1). Esse trabalho é uma análise preliminar com
123 o objetivo de ajustar a melhor condição termoterapia aos diferentes genótipos para
124 otimizar a obtenção de plantas regeneradas. É possível verificar que as diferentes
125 cultivares tem comportamento diferencial ao período de tratamento e, possivelmente, à
126 própria característica de potencial de regeneração.

127 **REFERÊNCIAS**

- 128 BARG, E; LESEMANN, DE.; VETTEN, HJ. Identification, partial characterization,
129 and distribution of viruses infecting allium crops in South an Southeast Asia. Acta
130 Horticulturae 358:251-258. 1994.
131 CARVALHO, MG. Viroses do alho. Informe Agropecuário 12(142): 41-43. 1986.

- 132 CHEN, J; ZHENG, HY; ANTONIW, JF; ADAMS, MJ; CHEN, JP; LIN, L. Detection
133 and classification of allexiviruses from garlic in China. *Archives of Virology*
134 149(3): 435-445. 2004.
- 135 CONCI, VC; CANAVELLI, AE & LUNELLO, PA. Yield losses associated with virus-
136 infected garlic plants during five successive years. *Plant Disease* 87: 1411-1415.
137 2003.
- 138 CONCI, V; NOME, SF; MILNE, RG. Filamentous viruses of garlic in Argentina. *Plant*
139 *Disease* 76: 594-596. 1992.
- 140 CONCI, VC; LUNELLO, P; BURASCHI, D. Variations of Leek yellow stripe virus
141 concentration in garlic and its incidence in Argentina. *Plant Disease* 86: 1085-1088.
142 2002.
- 143 DOVAS, IC; HATZILOUKAS, E; SALOMON, R; BARG, E; SHIBOLETH, Y;
144 NIKOLAOS, IK. Incidence of viruses infecting *Allium* spp. in Greece. *European*
145 *Journal of Plant Pathology* 107: 677-684. 2001.
- 146 FAJARDO, TVM; NISHIJIMA, M; BUSO, JA; TORRES, AC; ÁVILA, AC;
147 RESENDE, RO. Garlic Viral Complex: Identification of Potyviruses and Carlavirus
148 in Central Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 26: 619-626. 2001.
- 149 KARLOVA, K; DUSEK, K; STAVELIKOVA, H. Virus diseases in collection of
150 genetic resources of garlic in the Czech Republic. *Agriculture* 55: 58-60. 2009.
- 151 KOO, BJ; KANG, SC; CHANG, MU. Survey of garlic virus disease and phylogenetic
152 characterization of garlic viruses of genus *Allexivirus* isolated in Korea. *Journal of*
153 *Plant Pathology* 18: 237-243. 2002.
- 154 LUNELLO, P; DI RIENZO, J; CONCI, VC. Yield loss in garlic caused by Leek yellow
155 stripe virus Argentinean isolate. *Plant Disease* 91: 153-158. 2007.
- 156 MELO FILHO, PA; NAGATA, T; DUSI, AN; BUSO, JA; TORRES, AC; EIRAS, M;
157 RESENDE, RO. Detection of three *Allexivirus* species infecting garlic in Brazil.
158 *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39: 375-340. 2004.
- 159 MELO FILHO, PA; RESENDE, RO; CORDEIRO, CMT; BUSO, JA; TORRES, AC;
160 DUSI, AN. Viral reinfection affecting bulb production in garlic after seven years of
161 cultivation under field conditions. *European Journal of Plant Pathology* 116: 95-
162 101. 2006.
- 163 MITUTI, T; MARUBAYASHI, JM; MOURA, MF; KRAUSE-SAKATE, R; PAVAN,
164 MA. First Report of Shallot latent virus in Garlic in Brazil. *Plant Disease* 95(2):
165 227. 2011.
- 166 SHAHRAEEN, N; LESEMANN, DE; GHOTBI, T. Survey for viruses infecting onion,
167 garlic and leek crops in Iran. *EPPO Bulletin* 38: 131-135. 2008
- 168 SMEKALOVA, K; STAVELIKOVA, H; DUSEK, K. Distribution of viruses in the
169 garlic germplasm collection of the Czech Republic. *J Plant Pathol* 91: 273-274.
170 2010.
- 171 TAKAICHI, M; NAGAKUBO, T; OEDA, K. Mixed virus infection of garlic
172 determination by multivalent polyclonal antiserum and virus effects on disease
173 symptoms. *Plant Disease* 85: 71-75. 2001.
- 174 TAKAKI, F; SANO, T; YAMASHITA, K; FUJITA, F; UEDA, K; KATO, T. Complete
175 nucleotide sequences of attenuated and severe isolates of Leek yellow stripe virus
176 from garlic in northern Japan: Identification of three distinct virus types in garlic
177 and leek world-wide. *Archives of Virology* 150: 1135-1149. 2005.
- 178 TANABE, CMN. Avaliação da degenerescência em campo causada por fitovirose na
179 cultura de

180 alho (*Allium sativum* L.). Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília.
 181 Brasília. 1999. 91p.

182 TORRES, AC; FAJARDO, TVM.; DUSI, AN; RESENDE, RO. Shootip culture and
 183 thermotherapy in recovering virus free plants of garlic. *Horticultura Brasileira* 3:
 184 192-195. 2000.

185 TSUNEYOSHI, T; MATSUMI, T; NATSUAKI, T; SUMI, S. Nucleotide sequence
 186 analysis of virus isolates indicates the presences of three potyvirus species in
 187 *Allium* plants. *Archives of Virology* 143: 97-113. 1998.

188 WALKEY, DGA; WEBB, MJW; BOLLAND, CJ; MILLER, A. Production of virus-
 189 free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip
 190 culture. *Journal of Horticultural Science* 62: 211-220. 1987.

191 WANG, QC & VALKONEN, JPT. 2008a. Elimination of two viruses which interact
 192 synergistically from sweetpotato using shoot tip culture and cryotherapy. *Journal of*
 193 *Virological Methods* **154**: 135-145.

194 WANG, Q & VALKONEN, JPT. 2008b. Efficient elimination of sweet potato little leaf
 195 phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of *in vitro* grown shoot tips. *Plant*
 196 *Pathology* **57**: 338-347.

197 WANG Q; VALKONEN, JPT. 2009. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen
 198 eradication method. *Trends in Plant Science*, 14(3): 119–122.

199
 200 **Tabela 1.** Avaliação da regeneração de plantas de alho após o procedimento de limpeza
 201 clonal. Embrapa, 2012.

Genótipo	Termoterapia (dias)	Número de ápices caulinares cultivados	Número (e %) de plantas regeneradas, aos x dias após o cultivo dos ápices caulinares
Gigante do Núcleo	35 dias	39	0 (0%); 38
Gigante do Núcleo	36 dias	92	5 (5,43%); 37
Ribeiro	30 dias	54	1 (1,85%); 36
Ribeiro	31 dias	87	3 (3,45%); 35
RE518.1	35 dias	96	1 (1,04%); 31
RAL 41	30 dias	67	2 (2,99%); 30
Caturra	32 dias	7	1 (14,29%); 30
Caturra	33 dias	80	0 (0%); 29
Caturra	34 dias	17	0 (0%); 28
Chinês Real	30 dias	89	23 (25,84%); 23
Chinês Real	31 dias	50	2 (4%); 21
San Valentin	32 dias	75	33 (44%); 20
San Valentin	35 dias	41	1 (2,44%); 17
San Valentin	36 dias	69	8 (11,59%); 16
Caçador	42 dias	35	4 (11,43%); 10
Caçador	43 dias	52	3 (5,77%); 9
Caçador	44 dias	57	4 (7,02%); 8

202