

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

3 **Diego Apelfeler<sup>1</sup>; Fernanda Rausch Fernandes<sup>2</sup>;**

4 <sup>1</sup>Faculdade Anhanguera de Brasília, 71950-550 Taguatinga/DF. <sup>2</sup>Embrapa 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<sup>-1</sup>: 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. *EPP0 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