

**ROBSON JOSÉ DO NASCIMENTO**

**ANÁLISE MOLECULAR EM ALHO CONSUMO NACIONAL  
E IMPORTADO PARA DETECÇÃO DA PRESENÇA DE  
ALLEXIVÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Fitossanidade, Área de concentração em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Profº Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho – Orientador

Profº Dr Gilvan Pio Ribeiro – Co-orientador

Drª. Marleide Magalhães de Andrade Lima – Co-orientadora

**RECIFE – PE  
FEVEREIRO, 2006**

**ANÁLISE MOLECULAR EM ALHO CONSUMO NACIONAL  
E IMPORTADO PARA DETECÇÃO DA PRESENÇA DE  
ALLEXIVÍRUS**

**ROBSON JOSÉ DO NASCIMENTO**

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 21 de fevereiro de 2006

Orientador:

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho  
UFRPE

Examinadores:

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Gilvan Pio Ribeiro  
UFRPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Maria Alves de Oliveira  
URFPE

---

Dr<sup>a</sup>. Roseane Cavalcanti dos Santos  
Embrapa Algodão

**RECIFE – PE  
FEVEREIRO, 2006**

Aos meus pais, Mário Claudino do Nascimento e Mercedes Matos do Nascimento, pelo exemplo, apoio e incentivo durante toda a minha caminhada. Aos meus irmãos Jailson, Cidinea, Marlucia e Dylcilene, pelo apoio e incentivo. Aos meus queridos sobrinhos Elton, Paulo Júnior, Raise, Elan, Jaqueline, Elaine, Pedro, Gustavo, Lucas, Caroline e Talles pela amizade e carinho. Aos cunhados Paulo Santana Ferreira, Paulo Miguel, Edmilson Ramos e Lourdes Sirilo.

## **OFEREÇO**

À querida Carla Cristina Pinto, pelo amor, amizade, apoio e incentivo em momentos importantes de minha trajetória. Aos meus amigos Luis Henrique Costa, Wardsson Lustrino, Leandro Azevedo, Mateus Pagliarini e Paulo Ivam Fernandes, pelo apoio e companheirismo. Especialmente ao meu grande amigo Edson Marcio Mattiello, pelo apoio, companheirismo e incentivo durante a minha caminhada.

## **DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade oferecida para realização deste curso.

Ao professor Péricles de Albuquerque Melo Filho, pela orientação e ensinamentos transmitidos na realização deste trabalho.

Às Escolas Família Agrícola, pela oportunidade oferecida para realização dos cursos fundamental e médio.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela formação oferecida no curso de Graduação.

Ao professor João Pedro Pimentel, pela amizade e orientação na Graduação.

Aos professores do curso de Mestrado, em especial à professora Rosa de Lima Mariano e Romero Marinho de Moura, pelos ensinamentos, sobretudo, pelo respeito e admiração.

Ao professor Gilvan Pio Ribeiro e a Dr<sup>a</sup> Roseane Cavalcanti Santos, pela valiosa colaboração e conhecimento repassados.

Ao professor Reginaldo Carvalho, chefe do Laboratório de Genética, Bioquímica e sequenciamento de DNA, da UFRPE, pela facilitação do acesso à infraestrutura do Laboratório, onde este trabalho foi realizado.

Aos funcionários da Área de Fitossanidade, em especial a Ivanise e Darci Martins Correa.

Aos colegas de turma do Mestrado Rosenberg, Janaina, Daniele e Jorge, pela convivência e apoio.

Ao colega Luis Carlos, pela amizade e harmoniosa convivência.

À colega Genira Pereira de Andrade, pelo apoio e incentivo durante a execução deste trabalho.

Aos colegas do Córrego da Fortuna, em especial a Ana Paula, Neide, André, Janete e Eliane, pela atenção e amizade.

À querida Roberta, pela amizade, carinho e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Genética bioquímica e sequenciamento de DNA, do departamento de Biologia da UFRPE, em especial à Fabiana Cavalcante, pelo apoio e incentivo.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>iv</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
Aspectos gerais da cultura.....	13
Aspectos fitossanitário.....	17
O gênero <i>Allexivirus</i> .....	21
Referências bibliográficas.....	25
<b>CAPÍTULO II – ANÁLISE MOLECULAR E AJUSTE METODOLÓGICO PARA DETECÇÃO DE ALLEXIVÍRUS EM ALHO.....</b>	<b>29</b>
Resumo.....	30
Abstract.....	31
Material e Métodos.....	34
Resultados e Discussão.....	35
Referências Bibliográficas.....	37

**CAPÍTULO III - DETECÇÃO DE *Garlic virus C* (GarV-C) EM BULBOS**

**DE ALHO NOBRE NACIONAL E IMPORTADO.....41**

**Resumo.....42**

**Abstract.....43**

**Introdução.....44**

**Material e Métodos.....45**

**Resultados e Discussão.....57**

**Referências Bibliográficas.....58**

**CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES .....52**

**ANEXO.....54**

## RESUMO

O alho é uma monocotiledônea pertencente à família Aliaceae, originário da Ásia Central. No Brasil, foi introduzido pelos portugueses, na época do descobrimento, sendo amplamente utilizado na culinária até os dias atuais. Botanicamente, trata-se de uma herbácea agâmica, com aproximadamente 50 cm de altura, propagada via bulbilho, o que permite a manutenção das características agrônômicas. Este método de propagação possibilita uma eficiente disseminação de patógenos, principalmente vírus, que são um dos principais grupos de patógenos desta cultura, podendo causar uma redução do potencial produtivo entre 20 e 80%. O alho é hospedeiro natural de espécies virais pertencentes aos gêneros *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus*. Este último foi recentemente estabelecido como membro da família *Flexiviridae* e agrupa as espécies *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV), *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B), *Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D), *Garlic virus E* (GarV-E), *Garlic virus X* (GarV-X) e *Shallot virus X* (ShV-X). No Brasil, o alho consumo importado tem sido empregado para o plantio, o que se constitui um risco de introdução de espécies virais exóticas no país. Atualmente, a detecção de allexivírus em bulbos pode ser realizada por testes sorológicos e/ou moleculares, sendo necessário plantio para obtenção de tecido foliar com alta concentração de partículas virais, o que requer, em média, 30 dias. Os testes sorológicos são eficientes, no entanto, em razão da dificuldade para produção de anti-soros de alta qualidade, atualmente são menos indicados que os métodos moleculares. Objetivando reduzir o tempo para análise de detecção de allexivírus em alho, buscou-se um ajuste metodológico para extração de ácido nucléico diretamente dos primórdios foliares de bulbilhos. Amostras de alho consumo, oriundos do Rio Grande do Sul e importado da

Argentina foram analisadas, empregando-se primórdios foliares obtidos por dissecação dos bulbilhos para extração de RNA total com uso do reagente Trizol. As amplificações do fragmento genômico alvo foram realizadas via RT-PCR. Uma banda na altura correspondente a 500 pb foi observada, em gel de agarose, nas duas amostras estudadas. Os produtos de PCR foram transferidos para membranas para teste de *Southern Blot*, para o qual empregou-se uma sonda fria capaz de detectar espécies de *Allexivirus*, de cujo teste foi confirmado a presença de allexivírus. Outra análise de detecção de allexivírus foi realizada em amostras de alho consumo importado da Argentina, China e Espanha, seguindo a mesma metodologia, sendo verificada, uma banda na altura correspondente a 500 pb em amostras oriundas da Argentina e da China. Teste de *Southern Blot*, no qual empregou-se uma sonda fria específica para detectar GarV-C, confirmou infecção viral pela espécie citada. De acordo com os resultados obtidos constatou-se que a extração de RNA total diretamente de primórdios foliares, aliada ao uso de técnicas moleculares apresenta-se como um método rápido e eficiente para detecção de allexivírus. Constatou-se também, que a maior parte das amostras analisadas encontra-se infectada por allexivírus, evidenciando um padrão sanitário que contra-indica o uso deste tipo de material como semente, com o risco de introdução de espécies virais exóticas.

Palavras chaves: *Allium sativum*, alexivirose, RT-PCR, *Southern Blot*.

## ABSTRACT

The garlic is a monocotyledonous belonging to the family Alliaceae, original of the Central Asia. In Brazil, it was introduced by the Portuguese, at that time of the discovery, being widely used in the cookery until current days. Botanically, is considered as an agamic herbaceous plant, with about 50cm height, propagated via cloves, method that allows the maintenance of the agronomical characteristics. This propagation method enables an efficient pathogen dissemination, specially viruses, which are one of the main group of pathogens of this crop, causing a reduction of the productive potential between 20 and 80%. The garlic is natural host of virus species belonging to the genera: *Potyvirus*, *Carlavirus* and *Allexivirus*. This last was recently established as member of the family *Flexiviridae* that groups the species *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV), *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B), *Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D), *Garlic virus E* (GarV-E), *Garlic virus X* (GarV-X) and *Shallot virus X* (ShV-X). In Brazil, the imported consumption-garlic has been employed for planting, what constitute a risk of exotic virus species introduction in the country. Nowadays, allexivirus detection in bulb can be accomplished by serological and/or molecular tests, being necessary the obtainment of foliar tissue with high virus particle concentration, requiring an average of 30 days. The serological tests are efficient. However, in reason of the difficulties for obtaining high quality antisera, they are less recommended than the molecular ones. In order to reduce the time for detecting allexivirus in garlic, a methodological adjustment for nucleic acid extraction directly from foliar primordium of the cloves was undertaken. Consumption-garlic samples from Rio Grande do Sul and imported from Argentina were analyzed, employing foliar primordium, obtained by dissection of the cloves, for total RNA's extraction with the use of the Trizol reagent. The amplifications of the target genomic fragment were accomplished via RT-PCR. A band corresponding to 500 pb was observed in agarose gel in both samples. The gel was used in a *Southern Blot*, test employing a no radioactive probe

able to detect species of the genus *Allexivirus*, which confirmed the presence of allexivirus in the samples. Another allexivirus detection analysis was accomplished in consumption-garlic samples imported from Argentina, China and Spain, following the same methodology, being verified a band corresponding to 500 pb in the samples from Argentina and China. Test of *Southern Blot*, in which it was employed a specific probe for detecting GarV-C, confirmed the infection by this viral species. According to the obtained results, it was the total RNA extraction directly from foliar primordium, allied to the use of molecular techniques showed to be a rapid and efficient method for allexivirus detection. It was also verified that most of analyzed consumption-garlic samples were infected by allexivirus, evidencing a sanitary standard that disqualify this type of material for use as seed, with the risk of exotic virus species introduction.

Key words: *Allium sativum*, allexiviruses, RT-PCR, *Southern Blot*.

# **CAPÍTULO I**

---

## **INTRODUÇÃO**

## INTRODUÇÃO

### Aspectos gerais da cultura

O alho (*Allium sativum* L.) é uma monocotiledônea pertencente à família Aliaceae, originária da Ásia Central, onde se encontra o seu centro de diversidade. Registros históricos comprovam o uso desta planta por povos árabes, hindus e egípcios, em períodos pré-históricos, sendo este um dos cultivos mais antigos praticados pelo homem (FILGUEIRA, 2003; ALONSO, 1990). Este condimento apresenta em sua composição química, substâncias com propriedades terapêuticas, além de qualidades organolépticas que acrescentam excelente aroma e sabor aos alimentos, o que justifica o seu amplo uso na culinária mundial, desde a antiguidade (ALONSO, 1990; SATURNINO, 1978). No Brasil, o alho foi introduzido por nossos colonizadores e é até hoje utilizado na culinária nacional (FILGUEIRA, 2003).

Botanicamente, as plantas de alho apresentam aproximadamente 50 cm de altura. Trata-se de uma olerácea agâmica, que em condições de baixas temperaturas e fotoperíodo curto podem apresentar um pendoamento, seguido da emissão de um escapo floral, terminado por uma inflorescência do tipo umbela simples, todavia, mesmo com a produção de órgãos sexuais não ocorre a formação de sementes botânicas (FILGUEIRA, 2003). Em condições de baixas temperaturas e fotoperíodo longo as gemas apicais diferenciam-se formando bulbilhos, que em seu conjunto constituem o bulbo. O bulbo, também denominado popularmente “cabeça de alho”, apresenta formato arredondado, podendo ser levemente periniforme e em geral, pode ser constituído por cinco até 56 bulbilhos, os quais estão ligados ao caule pela base (MENEZES SOBRINHO, 1978). O caule verdadeiro é

formado por um disco comprimido, do qual se originam as raízes e as folhas. As raízes formam um sistema radicular do tipo fasciculado, estendendo-se por um raio de 50 cm, podendo ultrapassar um metro de profundidade (FILGUEIRA, 1982). As folhas se originam na parte superior do caule e se apresentam com formato estreito e alongado, cujas bainhas formam um pseudocaule.

No aspecto climático, para a obtenção de bons índices de produtividade, a cultura exige fotoperíodo longo e temperaturas amenas (18 a 20 °C) para fase inicial do ciclo e temperaturas mais baixas (10 a 15 °C) durante o período de bulbificação, contudo, pesquisadores brasileiros desenvolveram a técnica de vernalização pré-plantio, que consiste na frigidificação dos bulbilhos-semente, em câmaras com 3 a 4 C° e umidade relativa entre 70 e 80%, por um período de 40 a 55 dias, a depender da temperatura onde o bulbilho semente foi produzido e também da região de plantio (MENEZES SOBRINHO *et al.*, 1993; FILGUEIRA, 2003; RESENDE *et al.*, 2004).

Devido à variação climática, a escolha de cultivares adaptados às condições regionais é fundamental para o sucesso desta cultura, sendo a duração do ciclo de desenvolvimento o principal fator a ser considerado. Cultivares brasileiras apresentam ciclo de desenvolvimento com duração variada entre 4 e 4,9 meses (precoces), 5 e 5,9 meses (mediano) e acima de 5,9 meses (tardios) (MENEZES SOBRINHO *et al.*, 1993; LUCINI, 2004).

Em 2004, os plantios de alho em todo o mundo ocuparam uma área superior a um milhão de hectares, com uma produção superior a quatorze milhões de toneladas, sendo os maiores produtores mundiais: China, Índia, Coréia. (Tabela 1).

**Tabela 1.** Área, produção e produtividade mundial de alho e principais países produtores – 2004/2005, em ordem decrescente de produção

<b>País</b>	<b>Área (ha)</b>	<b>Produção (1000 t)</b>	<b>Produtividade (t. ha<sup>-1</sup>)</b>
China	647.200	11.093.050	17,10
Índia	120.000	500.000	4,10
Coréia	29.000	350.000	12,60
U.S.A.	12.790	236.960	18,50
Rússia	28.000	230.000	8,21
Egito	7.140	162.070	22,67
Espanha	18.000	145.300	8,07
Argentina	14.000	142.730	10,19
Mianmá	22.000	121.000	5,50
Turquia	15.000	99.500	6,63
Brasil	10.500	88.470	8,42
<b>Total</b>	<b>1.129.250</b>	<b>14.515.110</b>	<b>12,85</b>

Fonte: FAO, 2005

Na América do Sul, Argentina, Brasil e Chile destacam-se com as maiores áreas de produção desta cultura. A Argentina, com 14.000 ha e uma produção de 142.000 t, é o segundo maior exportador de alho para o Brasil, ficando atrás apenas da China. No Brasil, as áreas de cultivo de alho têm se concentrado nas regiões Sul e Centro-Oeste; no entanto, o plantio desta olerácea é viável em quase todas as regiões do território nacional, com exceção da região Norte, onde foram realizadas experiências favoráveis apenas nos Estados do Acre, Rondônia e Roraima (FONSECA, 1988; MENEZES SOBRINHO *et al.*, 1993; LUCINI, 2004). As maiores áreas de plantio concentram-se nos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Goiás, Santa Catarina e Bahia, sendo estes responsáveis por 90 % da produção nacional (Tabela 2).

**Tabela 2.** – Área plantada e produtividade média de alho nos principais Estados brasileiros – 2003/2004, em ordem decrescente de produção

<b>Estado</b>	<b>Área (ha)</b>	<b>Produtividade (t. ha<sup>-1</sup>)</b>
Rio Grande do Sul	3.997	6,32
MinasGerais	3.293	10,27
Goiás	2.393	10,14
Santa Catarina	2.145	7,29
Bahia	1.666	8,34
Paraná	700	4,58
Distrito Federal	300	9,00
Espírito Santo	272	6,74
São Paulo	150	9,10

Fonte: IBGE, 2004

No ano de 2004 foram cultivados aproximadamente 10.500 ha de alho no Brasil com uma produção de 88.420.000 t, o que coloca o país como um dos principais produtores mundiais; todavia, a produção é insuficiente para atender a demanda, sendo necessária a importação de 40% do produto, o que corresponde a uma evasão de divisas da ordem de 100 milhões de dólares anualmente (MENEZES SOBRINHO, 1997; LUCINI, 2004).

A cultura do alho é uma atividade artesanal e de alto valor social, sendo tradicionalmente praticada em pequenas áreas por agricultores familiares, meeiros e/ou proprietários. Seu cultivo exige grande quantidade de mão-de-obra, cerca de 240 homem/dia/ha, durante o período de cultivo (RESENDE *et al.*, 2004).

A tecnologia de produção desta cultura tem apresentado avanços significativos após a implantação do plano nacional de abastecimento de alho no início dos anos 80, quando

foram desenvolvidos cultivares adaptados às condições climáticas brasileiras, bem como a determinação de parâmetros fitotécnicos, como recomendação de adubação e necessidade hídrica (ICEPA, 1996).

Em 1970, a produtividade nacional era de 2,8 t. ha<sup>-1</sup>, passando para 4,6 t. ha<sup>-1</sup> em 1991 e 4,7 t. ha<sup>-1</sup> em 1995; sendo atualmente 8,9 t. ha<sup>-1</sup> (ICEPA, 1996; 2004); contudo, algumas regiões localizadas nos Estados de Minas Gerais e Goiás têm se destacado pelos avanços nos aspectos quantitativos e qualitativos, gerando produtividade média superior a 13 t. ha<sup>-1</sup>, (RESENDE *et al.*, 2004). Rendimentos inferiores a 1 t. ha<sup>-1</sup>, por outro lado, têm sido registrados em cultivos que não adotam tecnologia de produção apropriada (MENEZES SOBRINHO, 1997).

A despeito da produtividade atual alcançada, o Brasil, ainda não é competitivo frente ao alho importado, em razão principalmente, da baixa adoção de tecnologia de produção e manejo inadequado (LUCINI, 2004).

### **Aspectos fitossanitários**

Os aspectos fitossanitários constituem um dos principais fatores limitantes ao rendimento desta cultura. A ocorrência de pragas e doenças pode inviabilizar a atividade, devido à redução dos aspectos qualitativo e quantitativo a níveis insatisfatórios (LUCINI, 2004).

Doenças de etiologia fúngica têm se destacado com relevância para a podridão branca, causada pelo fungo *Sclerotium cepivorum* Berk. Trata-se de um patógeno que apresenta capacidade de sobrevivência no solo e em restos culturais por longos períodos, sob forma de micélio e/ou escleródios. Este fungo possui capacidade de atacar plantas de alho em qualquer época do ano e/ou fase fenológica. Sua agressividade é potencializada em

períodos de temperatura amena e umidade do solo próxima a capacidade de campo. Os bulbos constituem a principal forma de disseminação desse patógeno (LUCINI, 2004; MASSOLA JUNIOR *et al.*, 2005).

A mancha púrpura, também conhecida como alternária, é a segunda doença em importância para esta cultura, sendo frequentemente encontrada em todas as regiões produtoras de alho. O agente causal é o fungo *Alternaria porri* (Ellis) Cif, que possui como hospedeiro várias espécies pertencentes à família Aliaceae. Trata-se de um fungo de parte aérea, que apresenta capacidade de sobrevivência de uma estação para outra através de esporos e/ou micélio, em restos culturais ou no solo. Temperaturas entre 21 a 30 °C e alta umidade relativa do ar favorecem a ação deste patógeno que pode causar perdas na ordem de 50 a 60 % da produção (MENEZES SOBRINHO, 1978; LUCINI, 2004).

A fusariose ou podridão seca, ocasionada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (Hans.) Snyder & Hans, configura-se como outra importante doença para a cultura do alho, em razão dos danos ocasionados e pela capacidade de sobrevivência do seu agente em restos culturais e no solo, que se dá via micélio e/ou estrutura de resistência. As maiores ocorrências têm sido registradas em áreas onde se pratica cultivos sucessivos de alho (MASSOLA JUNIOR *et al.*, 2005).

A ferrugem é uma das doenças mais comuns da cultura do alho e apresenta como agente causal o fungo *Puccinia allii* G. Wint. A ação patogênica deste fungo é fortemente influenciada pelas condições climáticas, sendo as temperaturas amenas, entre 15 e 21°C, e alta umidade relativa, as condições ideais para seu desenvolvimento. O estágio fenológico também tem uma forte influência na agressividade deste patógeno (LUCINI, 2004; MASSOLA JUNIOR *et al.*, 2005).

Outras doenças de etiologia fúngica, com menor importância econômica, têm sido descritas, dentre as quais destaca-se mofo ou bolor azul, ocasionada por *Penicillium* sp. e a queima das pontas, causada por *Botrytinia squamosa* Vien-Bourg (*Botrytis squamosa* Walker) (LUCINI, 2004; MASSOLA JUNIOR *et al.*, 2005).

Doenças de etiologia bacteriana também têm sido descritas, como apodridão bacteriana causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Houben *et al.*; podridão bacteriana da escama, ocasionadas por *Burkholderia cepacia* (Palleroni & Holmes) Yabuichi *et al.* e queima bacteriana provocada por *Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens (LUCINI, 2004; MASSOLA JUNIOR *et al.*, 2005).

O nematóide *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) Filipjev, é o agente causal da muchadeira ou amarelão do alho, uma das doenças mais severas desta cultura. Este patógeno pode sobreviver no solo e/ou em restos culturais, sendo esta uma típica fonte de inóculo para os próximos cultivos. Os bulbilhos-semente são também importantes agentes de disseminação deste patógeno (FILGUEIRA, 2003).

Depois dos fungos os agentes virais destacam-se como outro importante problema fitossanitário da cultura do alho, em razão dos eficientes mecanismos de disseminação, via bulbilhos-semente e/ou por ácaros e insetos (MASSOLA JUNIOR *et al.*, 2005; ZAMBOLIM *et al.*, 2000; FILGUEIRA, 2003).

Espécies pertencentes aos gêneros *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus* têm sido detectadas em plantas de alho nas principais regiões produtoras em todo o mundo (CHEN *et al.*, 2004; MELO FILHO, 2003). No Brasil, já foram relatadas a ocorrência de *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) e *Leek yellow stripe virus* (LYSV), pertencentes ao gênero *Potyvirus*; *Garlic common latent virus* (GarCLV), membro do gênero *Carlavirus* (MASSOLA JUNIOR *et al.*, 2005) e *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B),

*Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D) e *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV), pertencentes ao gênero *Allexivirus* (MELO FILHO *et al.*, 2004).

Plantas infectadas por vírus apresentam-se assintomáticas ou com sintomas variados de leves necroses a mosaicos estriados, seguidos de uma progressiva redução da área foliar, no porte das plantas e no peso dos bulbos, caracterizando um subdesenvolvimento com baixo vigor vegetativo (RESENDE *et al.*, 1995). Segundo Dusi (1995), as infecções virais em alho geralmente são formadas por complexos constituídos de duas ou mais espécies, o que está de acordo com estudos realizados por Fajardo *et al.* (2001), onde foram detectados complexos virais formados pelas espécies OYDV, LYSV e GarCLV.

As perdas ocasionadas por viroses em alho têm sido potencializadas em razão dos eficientes mecanismos de disseminação e sobrevivência que estes agentes apresentam, aliados a condições climáticas apropriadas que dificultam a implementação de medidas de controle eficientes. Por isso, a realização do plantio em área isenta de patógenos, em época apropriada e o uso de bulbilho semente certificada, constituem quesitos de extrema importância para o sucesso desta cultura.

As baixas qualidades fisiológica e sanitária do alho semente têm sido indicadas como os principais fatores responsáveis pelo baixo rendimento desta aliícea. Paralelamente, a aquisição de alho semente representa 22,17% dos custos totais da produção, que corresponde, atualmente, a R\$ 5.250,00/ha (US\$ 2600,00/ha) (LUCINI, 2004). Uma alternativa adotada por produtores brasileiros, para minimizar os custos, tem sido o uso de alho consumo importado para o plantio (AGRIANUAL, 2002), embora este material não apresente os padrões sanitários necessário, representando, muitas vezes, risco de introdução de novas pragas e patógenos no país. Assim, o desenvolvimento de tecnologias que possam subsidiar os trabalhos de fiscalização fitossanitária e indexação de

alho semente certificado, visando prevenir a introdução de espécies virais exóticas, é de relevante significado para a sustentabilidade da alicultura nacional.

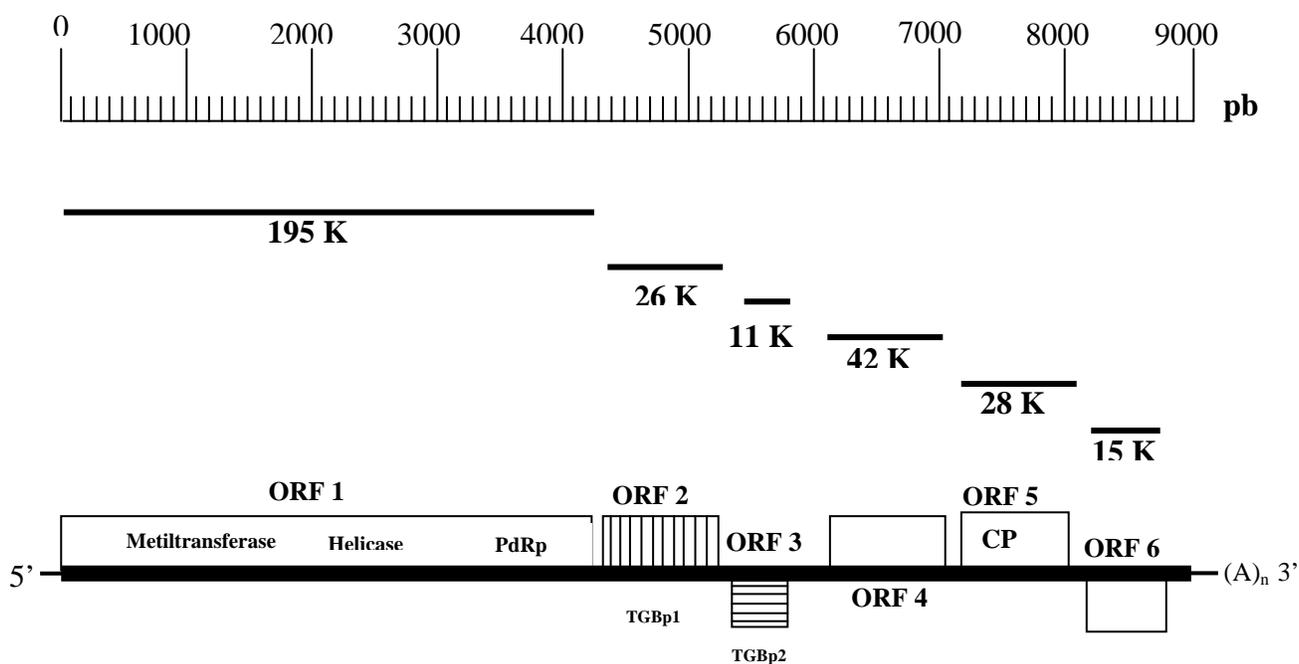
### **O gênero *Allexivirus***

A primeira espécie membro do gênero *Allexivirus*, denominada *Shallot virus X* (ShV-X) foi relatada nos anos 70 por Razvjki. O termo allexivírus originou-se das iniciais do nome científico do hospedeiro, (*Allium*). Atualmente este gênero está classificado na família *Flexiviridae*, onde se encontram também os gêneros *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus*, *Potexvirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus* e *Mandarivirus* (ADAMS *et al.*, 2004; FAUQUERT *et al.*, 2005).

O gênero *Allexivirus* é constituído de oito espécies: GarMbFV, GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E, GarV-X e ShV-X, sendo esta última a espécie tipo deste gênero (ADAMS *et al.*, 2004; ICTV, 2005). O ácido nucléico é formado por moléculas de RNA de fita simples, senso positivo, com cerca de 9000 nucleotídeos, encapsidadas em partículas monopartidas, longas e flexuosas, com aproximadamente 800 nm de comprimento e 12 nm de largura (FOUQUERT *et al.*, 2005). A região 3' é constituída de por uma cauda poli-A e a região 5' formada por 98 nucleotídeos que não codificam proteínas, tendo provavelmente a função de proteger o genoma viral (ADAMS *et al.*, 2004).

O RNA genômico dos allexivírus é constituído de seis fases abertas de leitura (*Open Reading Frame-ORF*) e apresenta uma estratégia de replicação sub-genômica. A ORF1 codifica uma replicase com peso molecular de 170 a 195 kDa, sendo também codificadas Metiltransferase (Mt), Helicase (Hel) e RNA-dependente de RNA Polimerase (RdRp), que atuam como replicases (CHEN *et al.*, 2001; ADAMS *et al.*, 2004). A ORF2 codifica uma proteína de 25-28 kDa, que constitui um bloco de triplo-gene de proteínas 1 (TGBp1), cuja

função é desconhecida e a ORF3 é responsável pela codificação de uma proteína de 11-12 kDa, a qual forma o TGBp2, também sem função conhecida (CHEN *et al.*, 2001; ADAMS *et al.*, 2004). A ORF4 apresenta um código para a síntese de uma proteína de 32-43 kDa, cuja função ainda não é identificada, no entanto, sabe-se que esta proteína é rica em serina. A ORF5 por sua vez, codifica para proteína da capa protéica (CP), que apresenta um peso molecular entre 26-29 kDa e se trata de uma região bem conservada em todas as espécies do gênero (CHEN *et al.*, 2001) e a ORF 6 codifica para proteína rica em leucina e apresenta um peso de 14-15 kDa (Figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática da organização genômica do *Shallot virus X*, espécie, tipo do gênero *Allexivirus* (CHEN *et al.*, 2004).

A disseminação desses agentes é realizada por ácaros da espécie *Aceria tulipae* (Keifer) (YAMASHITA *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 2001), podendo ser transmitido

mecanicamente. Contudo, a principal forma de disseminação destes vírus ocorre via bulbilho semente. A gama de hospedeiros dos allexivírus é restrita a espécies pertencentes ao gênero *Allium*, além das espécies *Chenopodium murale* e *C. quinoa* (MELO FILHO, 2003; ADAMS *et al.*, 2004).

Espécies do gênero *Allexivirus* foram recentemente detectadas no Brasil, para as quais os processos biológicos envolvidos na relação patógeno/hospedeiro ainda pouco conhecidos, no entanto, segundo Conci *et al.* (2003), plantas de alho infectadas têm seu rendimento parcialmente comprometido. Para tanto, faz-se necessário a realização de estudos visando elucidar os processos biológicos envolvidos, bem como a comparação com outras espécies isoladas e descritas em outros países (MELO FILHO *et al.*, 2004).

## Referências Bibliográficas

ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; BAR-JOSEPH, M.; BRUNT, A.A.; CANDRESSE, T.; FOSTER, G.D.; MARTELLI, G.P.; MILNE, R.G.; FAUQUET, C.M. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. **Archives of Virology**, New York, v. 149, n. 3, p.1045-1060, 2004.

AGRIANUAL 2002. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP. Consultoria e Comércio, 2001. p.155-161.

ALONSO, C.R.G. (Ed) **El ajo**: cultivo y aprovechamiento. Córdoba: Mundi-Prensa. 1990. v.1,168p.

CHEN, J.; CHEN, J.; ADAMS, M.J. Molecular characterization of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. **Archives of Virology**, New York, v.146, n.2, p.1841-1853, 2001.

CHEN, J.; ZHENG, H.Y.; ANTONIW, J.F.; ADAMS, M.J.; CHEN, J.P.; LIN, L. Detection and classification of allexiviruses from garlic in China. **Archives of Virology**, New York, v.149, n.3, p.435-445, 2004.

CONCI, V.C.; CANAVALLI, A.; LUNELLO, P.; DI RIBEIRO, J.; NOME, S.F.; ZUMELZU, G.; ITALIA, R. Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. **Plant Disease**, St. Paul, v.87, n.12, p. 1411-1415, 2003.

DUSI, A.N. Doenças causadas por vírus em alho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.17, n. 183, p.19-21,1995.

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

FAO. **Food and Agriculture Organization**. Levantamento estatístico. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 22 de janeiro de 2006.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, U. DESSELBERGER, BALL L.A. (Eds.) **Virus taxonomy eighth report of the international committee on taxonomy of viruses**. Academic Press, San Diego: Academic press, 2005.1162p. 2005.

FILGUEIRA, F.A.R. Aliáceas, cebola e outros condimentos. In: FILGUEIRA, F.A.R. (Ed.) **Novo manual de olericultura: a moderna tecnologia na produção de comercialização de hortaliças**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2003. v.1, p. 252-274.

FILGUEIRA, F.A.R. (Ed.) Aliáceas I. In: FILGUEIRA, F.A.R. (Ed.) **Manual de olericultura: cultura e comercialização**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1982. v.2, p105-167.

FONSECA, A.F.A.; ANGELETTI, M.P. **Recomendações técnicas para o cultivo de alho (*Allium sativum* L.) no estado de Rondônia**. Porto Velho: Embrapa, 1988. 15p. (Circular técnica, 15).

IBGE. **Instituto brasileiro de geografia e estatística**. Disponível em: <<http://www.ibge.org.br/>>. Acesso em: 17 de agosto de 2005.

ICEPA. **Instituto de planejamento e economia agrícola de Santa Catarina**. Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2003-2004. Disponível em: <<http://www.icepa.com.br/>>. Acesso em: 14 de agosto de 2005.

ICEPA. **Instituto de planejamento e economia agrícola de Santa Catarina**. Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 1996. Disponível em: <<http://www.icepa.com.br/>>. Acesso em: 14 de agosto de 2005.

LUCINI, M.A. (Ed.) **Manual prático de produção de alho**. 2<sup>a</sup>.ed. Curitiba: GRN. 2004. 140 p.

MASSOLA JUNIOR, N.S.; JESUS JUNIOR, W.C.; KIMATI, H. Doenças do alho e da cebola. In: KIMATI, H; AMORIM, L.; RESENDE, J.A.M.; BERGAMIN. FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds) **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. v.2ª. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.v. 2, p.53-63.

MELO FILHO, P.A.; NAGATA, T.; DUSI, A.N.; BUSO, J.A.; TORRES, A.C.; EIRAS, M.; RESENDE, R.O. Detection of three allexivirus species infecting garlic in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.8, p.735-740, 2004.

MENEZES SOBRINHO, J.A. Origem e botânica do alho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.4, n.48, p.14, 1978.

MENEZES SOBRINHO, J.A. **Cultivo de alho**. Brasília: Embrapa, 1997. 23 p. (Instruções técnicas).

MENEZES SOBRINHO, J.A.; LOPES, C.A.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; CHARCHAR, J.M.; CRISÓSTOMO, L.A.; CARRIJO, O.A.; BARBOSA, S. **A cultura do alho**. Brasília: Embrapa, 1993. 50 p. (Coleção plantar).

RESENDE, F. V.; DUSI, A.N.; MELO, W.F. **Recomendações básicas para a produção de alho**. Brasília: Embrapa, 2004. 4 p. (Comunicado Técnico).

RESENDE, F.V.; SOUSA, R.J.; PASQUAL, M; RESENDE, J.T.V. Degenerescência de clones de alho provenientes de cultura de tecido após quatro multiplicações em condições de campo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.13, n. 1, p.107. 1995.

SATURNINO, H.M. Propriedades químicas e uso do alho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.4, n.48, p.64-68, 1978.

YAMASHITA, K.; SAKAL, J.; HANADA, K. Charaterization of a new virus from Garlic (*Allium sativum* L.), *Garlic mite-borne mosaic virus*. **Annual Phytopatology Society Japan**. v.62, p.183-189, 1996.

ZAMBOLIM.L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Eds) **Controle de doenças de plantas hortaliças**. Viçosa: UFV. 2000. v.2, 879p.

## **CAPÍTULO II**

---

**AJUSTE METODOLÓGICO E ANÁLISE MOLECULAR  
PARA DETECÇÃO DE ALLEXIVÍRUS EM ALHO**

## 1 **Ajuste metodológico e análise molecular para detecção de allexivírus em alho**

2 Robson José do Nascimento<sup>1,3</sup>, Gilvan Pio-Ribeiro<sup>1</sup>, Roseane Cavalcanti dos Santos<sup>2</sup>,

3 Péricles de Albuquerque Melo Filho<sup>1</sup>

4 <sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-  
5 900, Recife, PE. E-mail: pericles@ufrpe.br; <sup>2</sup>Embrapa Algodão, CP 174, CEP 58107-720,  
6 Campina Grande, PB; <sup>3</sup>Bolsista do CNPq.

7 Data de chegada: / / . Aceito para publicação em: / / .

8 Autor (a) para correspondência: Péricles de Albuquerque Melo Filho.

---

### 10 **RESUMO**

11 Nascimento, R.J.; Pio-Ribeiro, G.; Santos, R.C.; Melo Filho, P. A. Análise molecular e  
12 ajuste metodológico para detecção de allexivírus em alho. *Summa Phytopathologica*

13 Nos procedimentos de detecção de allexivirus em bulbos de alho, tem-se como rotina o  
14 plantio de bulbilhos para obtenção de tecido foliar a ser analisado via testes sorológicos  
15 e/ou moleculares. A disponibilização das plantas em casa de vegetação implica em gastos  
16 com a manutenção e requer, em média, 30 dias. Em áreas isentas desses vírus, corre-se,  
17 ainda, o risco de sua introdução e disseminação. No presente trabalho buscou-se ajustar um  
18 protocolo para detecção rápida de allexivírus em alho a partir de primórdios foliares,  
19 objetivando reduzir os riscos de disseminação viral e, principalmente, diminuir o tempo e  
20 os custos das análises de indexação de material em serviços de quarentena. Primórdios  
21 foliares obtidos de bulbilhos de alho consumo, oriundos do Rio Grande do Sul e importado  
22 da Argentina foram dissecados para extração de RNA total a partir de 0,1 g de tecido. A  
23 seguir foram conduzidos reações de RT-PCR com um par de oligonucleotídeos, capaz de

24 gerar um fragmento de 500 pb relativo à porção interna do gene da capa protéica de várias  
25 espécies do gênero *Allexivirus*. Uma banda na altura esperada foi visualizada, via gel de  
26 agarose e, posteriormente, confirmada em teste de *Southern Blot*, com emprego de uma  
27 sonda fria. A obtenção de RNA total diretamente de primórdios foliares de bulbilhos e seu  
28 uso em análise de RT-PCR, constituem-se em uma metodologia econômica, rápida e segura  
29 para a detecção de allexivírus em bulbos de alho.

30 Palavras-chave adicionais: *Allium sativum*, alexiviroses, *Southern Blot*, RT-PCR.

---

31

### 32 **ABSTRACT**

33 Nascimento, R.J.; Pio-Ribeiro, G.; Santos, R.C.; Melo Filho, P.A. Molecular analysis and  
34 methodological adjustment for allexivirus detection in garlic. *Summa Phytopathologica*

35 In procedures for detecting allexiviruses in garlic bulbs, routinely cloves are planted for  
36 obtainment foliar tissue to be analyzed by serological and/or molecular tests. The  
37 availability of the plants under greenhouse implies in expenses with the maintenance and  
38 requires around 30 days. In areas free of these viruses, there is also the risk of their  
39 introduction and dissemination. This work presents an adjustment of protocol aiming fast  
40 detection of allexiviruses, using foliar primordia as test material, eliminating the risk of  
41 virus escaping and decreasing the time and the costs necessary for material indexation  
42 analyses in quarantine services. Foliar primordia obtained from cloves of consumption-  
43 garlic, from Rio Grande do Sul and imported from Argentina were dissected for total RNA  
44 extraction, using 0,1g of tissue of each sample. RT-PCR reactions were performed with a  
45 pair of primers able to amplify a fragment of 500 pb, relative to the internal portion of the  
46 coat protein gene of several species of the genus *Allexivirus*. A band in the expected height

47 was visualized in agarose gels and afterward confirmed in *Southern Blot* test, with the use  
48 of a cold probe. Total RNA obtainment directly from foliar primordia of cloves and its use  
49 in RT-PCR analysis, constitute an economic, fast and secure methodology for allexivirus  
50 detection in garlic bulbs.

51 Additional keywords: *Allium sativum*, allexiviruses, Southern Blot, RT-PCR.

---

52

53 O alho (*Allium sativum* L.) destaca-se como uma das mais importantes hortaliças  
54 cultivadas no Brasil, tanto pelo seu valor econômico como social, sendo esta uma atividade  
55 praticada principalmente por pequenos agricultores que vivem da agricultura familiar (8,  
56 10).

57 Os cultivares de alho plantados no Brasil são agâmicos, sendo propagados  
58 vegetativamente via bulbilho, o que possibilita uma eficiente disseminação de patógenos,  
59 principalmente vírus (18). Em plantios sucessivos de bulbilhos infectados, têm sido  
60 relatados aumentos progressivos da taxa de infecção e conseqüentes redução da  
61 produtividade e qualidade do produto colhido (4, 6, 15, 16, 18).

62 O alho é hospedeiro natural de espécies virais pertencentes aos gêneros *Potyvirus*,  
63 *Carlavirus* e *Allexivirus*, podendo causar infecções por complexos virais com duas ou mais  
64 espécies (6). Os sintomas produzidos por estes agentes são: mosaico, estrias e clorose, além  
65 de redução do tamanho da planta e peso dos bulbos (6, 7, 12), plantas infectadas  
66 assintomáticas também podem ser encontradas (12, 16).

67 Os allexivírus, recentemente detectados no Brasil, *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic*  
68 *virus B* (GarV-B), *Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D) e *Garlic mite-borne*  
69 *filamentous virus* (GarMbFV), têm se destacado como um dos mais importantes grupos de  
70 vírus desta cultura (12). As espécies *Garlic virus E* (GarV-E), *Garlic virus X* (GarV-X) e

71 *Shallot virus X* (ShV-X) ainda não foram detectadas no Brasil e representam um risco para  
72 a alicultura nacional, uma vez que ocorrem na Argentina (9,11) e na China (3), países  
73 tradicionalmente exportadores de alho para o Brasil (1, 10).

74 Os danos ocasionados por allexivírus ainda são pouco conhecidos, contudo o uso de  
75 alho semente certificado tem possibilitado rendimentos superiores em até 216 %,  
76 comparado com o uso de bulbilho semente infectados (4, 18). Assim, a qualidade sanitária  
77 das sementes de alho destaca-se como um dos fatores mais importantes para aumentar o  
78 rendimento da cultura, sendo a limpeza clonal, através da cultura de ápices caulinares, uma  
79 alternativa promissora (2, 4, 18).

80 A detecção de vírus de alho tradicionalmente tem sido realizada via testes  
81 sorológicos (6), para os quais se faz necessário a obtenção de tecido foliar com alta  
82 concentração de partículas virais, através da prévia brotação de bulbilhos. A aquisição de  
83 anti-soro de alta qualidade também tem sido um entrave para a realização destes testes, em  
84 função do processo dispendioso para a sua produção (2, 6). No entanto, mesmo em  
85 condições ideais os testes sorológicos em alho apresentam grau de confiabilidade inferior  
86 aos testes moleculares (5).

87 O Brasil é um tradicional importador de alho consumo (10, 15), sendo parte destas  
88 importações destinadas ao plantio (1), o que configura em risco de introdução de espécies  
89 virais exóticas em lavouras brasileiras. Segundo Carvalho (2), faz-se necessário a  
90 implementação de um programa de fiscalização sanitária e produção de sementes livres de  
91 vírus, sendo fundamental a adoção de metodologias de detecção sensíveis, confiáveis e  
92 aplicáveis em larga escala.

93 O presente trabalho teve por objetivo ajustar um protocolo para detecção de  
94 allexivírus, a partir de primórdios foliares coletados de bulbilhos infectados, de modo a

95 reduzir o tempo de análise de detecção em laboratórios de quarentena e para indexação de  
96 alho semente, além de minimizar os risco de introdução de espécies virais exóticas em  
97 áreas livres desses agentes.

#### 98 MATERIAL E MÉTODOS

99 Bulbos de alho nobre oriundos do Rio Grande do Sul e da Argentina foram  
100 coletados na Central de Abastecimento do Estado de Pernambuco (CEAGEPE). De cada  
101 amostra foram coletados 0,1g de tecido do primórdio foliar, retirado via dissecação de  
102 bulbilhos (Figura 1A) e empregado para extração de RNA total, utilizando o reagente  
103 Trizol (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante.

104 Para as reações de RT utilizou-se: 1,0 µL do oligonucleotídeo reverso AlexU2  
105 (5'CCCAAGCTTGCATGGGCTTGCTACCACAA3'); 0,25 mM de dNTP; 2,0 µL de RNA  
106 total; 1 U de AMV e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, em um volume final de 25 µL. O oligonucleotídeo  
107 AlexU2 foi desenhado especificamente para anelar internamente no gene da capa protéica  
108 de GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D e GarMbFV obtido pelo alinhamento de seqüências  
109 de allexivírus depositadas no GenBank (13). A reação durou 2 h a 42 °C, seguida por 10  
110 min a 60 °C. A seguir, procedeu-se a amplificação da seqüência alvo via PCR,  
111 empregando-se 1,0 µL do oligonucleotídeo reverso AlexU2 e 1,0 µL do oligonucleotídeo  
112 senso AlexU1 (5'CCCAAGCTTGCATGGGCTTGCTACCACAA3'), obtido da mesma  
113 maneira que o reverso; 0,25 mM de dNTP; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1 U da *Taq* polimerase  
114 (Invitrogen) em um volume final de 25 µL. As condições de PCR utilizadas foram: um  
115 ciclo de desnaturação a 95 °C/ 5 min, 40 ciclos de desnaturação a 94 °C/1 min, anelamento  
116 a 53 °C/1 min e extensão a 72 °C/1 min e 30 seg e um ciclo final de extensão a 72 °C/5  
117 min. Os produtos desta reação foram analisados em gel de agarose (0.8%) e posteriormente

118 transferidos para uma membrana (Hybond-N-Nylon, Amersham Life Science®) para teste  
119 de *Southern Blot* com sonda fria. A sonda empregada refere-se a um fragmento de 752 pb  
120 do gene da capa protéica de GarV-C, produzido por Melo Filho (13), que empregou um par  
121 oligonucleotídeos específicos para esta espécie. Para marcação da sonda, utilizou-se o kit  
122 “Dig DNA Labeling and Detection” (Roche), onde o DNA foi marcado com digoxigenina. A  
123 revelação foi procedida com uma mistura de sais Bromo-4-Cloro-3-Indolil-Fosfato (BCIP,  
124 50mg/mL) e Nitro Blue Tetrazólio (NBT, 75 mg/mL), no escuro e à temperatura ambiente  
125 (17).

## 126 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

127 O produto de PCR, gerado a partir de RNA total obtido de primórdios foliares de  
128 bulbilhos dissecados, apresentou uma banda na altura correspondente a 500 pb, conforme  
129 esperado, demonstrando a infecção por allexivírus nas amostras oriundas do Rio Grande do  
130 Sul e da Argentina (Figura 1B). A obtenção de bandas na altura correspondente a 500 pb,  
131 empregando o par de Oligonucleotídeos AlexU1 e AlexU2, esta em consonância com Melo  
132 Filho (13), demonstrando a confiabilidade do teste e indicando aplicabilidade desta nova  
133 metodologia, que possibilitou a obtenção de resultados semelhante aos descritos na  
134 literatura (3, 5), obtidos com procedimentos mais trabalhosos.

135 O teste de *Southern Blot*, também confirmou a infecção por allexivírus, nas duas  
136 amostras testadas (Figura 1C), de acordo com os resultados obtidos por Melo Filho (14),  
137 que comprovou a sua eficiência para hibridização com GarV-C.

138 A extração de RNA total diretamente dos primórdios foliares destaca-se como o  
139 elemento principal da presente metodologia, a qual permitiu o fornecimento de quantidade

140 de ácido nucléico viral suficiente para a realização de transcrição reversa e amplificação do  
141 fragmento genômico alvo.

142 Essa metodologia permite também a praticidade e rapidez nas análises de detecção  
143 desses vírus de planta, possibilitando a obtenção de resultados em apenas um a dois dias.  
144 Ao mesmo tempo a metodologia caracteriza-se como uma alternativa mais segura para a  
145 detecção de vírus em alho, visto que nos procedimentos descritos na literatura (5, 13), faz-  
146 se necessário a previa brotação dos bulbilhos, por um período médio de 30 dias. Durante  
147 este período, a exposição das planta de alho em crescimento, potencializa a disseminação  
148 desses agentes virais presentes no material a ser testado via ação de ácaros vetores.

149 O método apresenta ainda a possibilidade de ser adaptado para uso em  
150 procedimentos quarentenários, visando a detecção de outras espécies de vírus de alho, tais  
151 como: *Onion yellow drarf virus* (OYDV) e *Leek yellow stripe virus* (LYSV), pela simples  
152 utilização de oligonucleotídeos específicos e com isso, reduzir ainda mais o período de  
153 retenção do produto nos portos e principalmente, os custos alfandegários.

#### 154 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 155 1. Agriannual 2002: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP. Consultoria e  
156 Comércio, 2001. p.155-161.
- 157 2. Carvalho, M.G. Viroses do alho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.12, n. 142,  
158 p.41-43, 1986.
- 159 3. Chen, J.; Zheng, H.Y.; Antoniw, J.F.; ADAMS, M.J.; Chen, J.P.; Lin, L. Detection and  
160 classification of allexiviruses from garlic in China. **Archives of Virology**, New York,  
161 v.149, n.3, p.435-445, 2004.

- 162 4. Conci, V.C.; Canavalli, A.; Lunello, P.; Di Ribeiro, J.; Nome, S.F.; Zumelzu, G.; Italia,  
163 R. Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years.  
164 **Plant Disease**, St. Paul, v.87, n.12, p. 1411-1415, 2003.
- 165 5. Dovas, C.I.; Hatziloukas, E.; Salomon, R.; Barg, E.; Shibolet, Y.; Katis, N.I.  
166 Comparison of methods for virus detection in *Allium* spp. **Journal of Phytopathology**,  
167 Berlin, v.149, n.11, p.731-737, 2001.
- 168 6. Dusi, A.N. Doenças causadas por vírus em alho. **Informe Agropecuário**, Belo  
169 Horizonte, v.17, n. 183, p.19-21,1995.
- 170 7. Fajardo, T.V.M.; Nishijima, M.; Buso, J.A.; Torres, A.C. Ávila, A.C.; Resende, R.O.  
171 Garlic viral complex: indentification of potyviruses and carlavirus in central Brazil.  
172 **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.3, p.619-626, 2001.
- 173 8. Filgueira, F.A.R. Aliáceas cebola e outros condimentos. In: Filgueira, F.A.R. (ed.) **Novo**  
174 **manual de olericultura**: a moderna tecnologia na produção de e comercialização de  
175 hortaliças. 2 ed. Viçosa: UFV, 2003. v.1, p. 252-274.
- 176 9. Helgueira, M.; Bravo-Almoneque, F.; Kobayashi, K.; Rabinowicz, P.D.; Conci, V.;  
177 Mentaberry, A. Immunological detection of a GarV-type virus in Argentine garlic  
178 cultivares. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, n.9, p.1005-1010, 1997.
- 179 10. ICEPA. **Instituto de planejamento e economia agrícola de Santa Catarina**. Síntese  
180 anual da agricultura de Santa Catarina 2003-2004. Disponível em:  
181 <http://www.icepa.com.br/>>. Acesso em: 14 de agosto de 2005.
- 182 11. Lunello. P.; Bravo-Almonacid, F.; Kobayashi, K.; Helguera, M.; Nome, S.F.;  
183 Mentaberry, A.; Conci, V.C. Distribution of garlic virus a in different garlic production  
184 regions of Argentina. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v.82, n.1, p.17-21, 2000.

- 185 12. Massola Júnior, N.S.; Jesus Junior, W.C.; Kimati, H. Doenças do alho e da cebola (eds)  
186 In: Kimati, H; Amorim,L.; Resende, J.A.M.; Bergamin. Filho, A.; Camargo, L.E.A.  
187 **Manual de fitopatologia:** doenças de plantas cultivadas. 2ª ed. São Paulo: Agronômica  
188 Ceres, 2005. v.2, p.53-63.
- 189 13. Melo Filho, P.A.; Nagata, T.; Dusi, A.N.; Buso, J.A.; Torres, A.C.; Eiras, M.; Resende,  
190 R.O. Detection of three allexivirus species infecting garlic in Brazil. **Pesquisa**  
191 **Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.8, p.735-740, 2004.
- 192 14. Melo Filho, P.A. **Deteccão e caracterização molecular de allexivirus e estudo de**  
193 **degenerescência em plantas de alho (*Allium sativum* L.) provocada por vírus.**  
194 2003.118f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Faculdade de Agronomia – Universidade  
195 de Brasília, Brasília.
- 196 15. Menezes Sobrinho, J.A. **Cultivo de alho.** Brasília: Embrapa, 1997. 23 p. (Instruções  
197 técnicas).
- 198 16. Resende, F. V.; Dusi, A.N.; Melo, W.F. **Recomendações básicas para a produção de**  
199 **alho.** Brasília: Embrapa, 2004. 4 p. (Comunicado Técnico).
- 200 17. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. **Molecular cloning – A laboratory manual.** 2ª  
201 ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 202 18. Torres, A.C.; Dusi, A.N.; Oliveira, R.; Busi; J.A. **Produção de alho-semente com alta**  
203 **qualidade fitossanitária mediante cultura de ápices caulinares.** Brasília: Embrapa,  
204 2001. 8 p. (Circular Técnica 27).
- 205  
206  
207

208

209

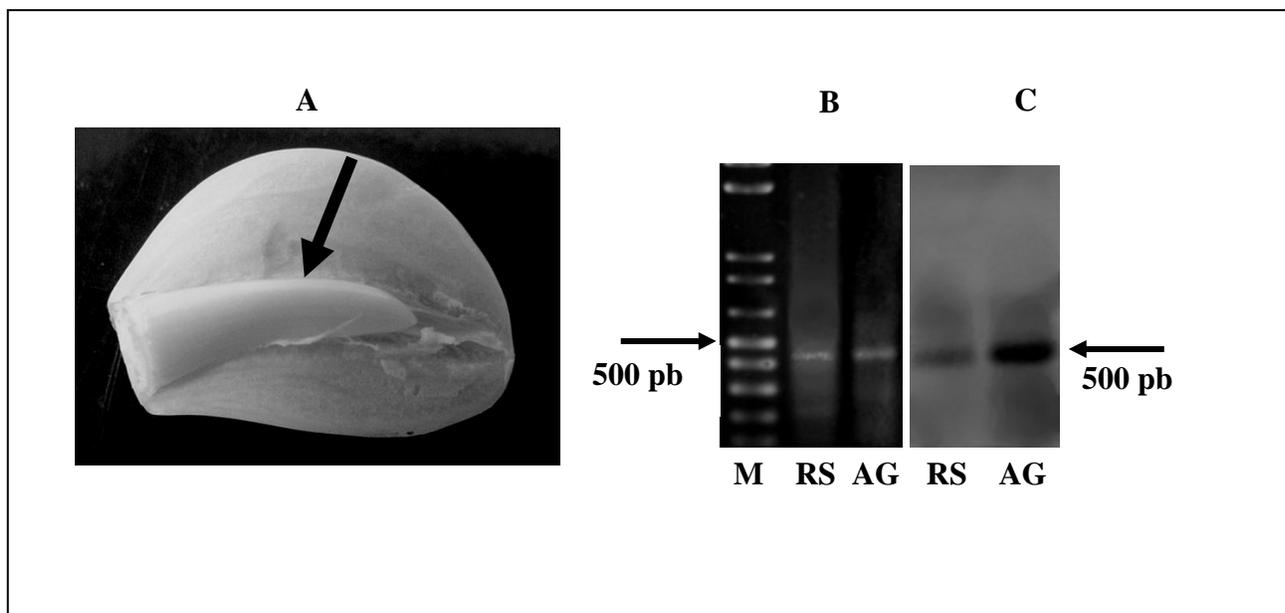
210

211

212

213

214



215 **Figura 1.** (A)- Detalhe de um bulbilho de alho dissecado, apresentando o primórdio foliar;

216 (B)- Produto de PCR em gel de agarose (0,8%), obtidos de RNA total extraído de bulbilho

217 de alho, (M- Marcador Lader plus, RS-Rio Grande do Sul, AG-Argentina); (C) - Membrana

218 obtida a partir de *Southern Blot* com sinal positivo para as respectivas análises de PCR.

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

## **CAPÍTULO III**

---

**DETECÇÃO DE *Garlic virus C* EM BULBOS DE ALHO**

**NOBRE IMPORTADO**

## 1 **Detecção de *Garlic virus C* em Bulbos de Alho Nobre Importado**

2 Robson J.do Nascimento<sup>1\*</sup>, Gilvan Pio-Ribeiro<sup>1</sup>, Roseane C. dos Santos<sup>2</sup> & Péricles de A.

3 Melo Filho<sup>1</sup>

4 <sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-  
5 900, Recife, PE, e-mail:pericles@ufrpe.br; <sup>2</sup>Embrapa Algodão, Cx. Postal 174, CEP 58107-  
6 720, Campina Grande, PB

7 (Aceito para publicação em / / )

8 Autor para correspondência: Péricles de A. Melo Filho

---

9 Nascimento, R.J., Pio-Ribeiro, G., Santos, R.C. & Melo Filho, P.A. Detecção de *Garlic*  
10 *virus C* em bulbos de alho nobre importado. Fitopatologia Brasileira

### 11 **RESUMO**

12 As qualidades fisiológicas e sanitárias dos bulbilhos-semente de alho destacam-se como  
13 fatores preponderantes para a obtenção de produtividades satisfatórias. Embora a sanidade  
14 do alho importado seja ainda pouco conhecida, produtores brasileiros têm utilizado o alho  
15 consumo importado para o plantio, visando baixar os custos de produção. Neste trabalho,  
16 procedeu-se uma análise fitossanitária para a detecção de espécies virais pertencentes ao  
17 gênero *Allexivirus*, em amostras de alho consumo importado da Argentina, China e  
18 Espanha. A extração de RNA total foi procedida empregando-se o reagente Trizol, a partir  
19 de primórdios foliares obtidos de bulbilhos dissecados. As sínteses e amplificações de  
20 cDNA foram realizadas via RT-PCR, empregando-se o par de oligonucleotídeos AlexU1 e  
21 AlexU2 capaz de detectar *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B), *Garlic virus*  
22 *C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D) e *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV).  
23 Os produtos das amplificações foram analisados via gel de agarose, sendo verificado uma  
24 banda na altura correspondente a 500 pb, em amostras oriundas da Argentina e da China.

25 Testes de *Southern Blot* confirmaram a infecção viral por GarV-C. Portanto, o alho  
26 consumo importado não apresenta padrões sanitários apropriados para o plantio e seu uso  
27 como alho semente evidência o risco de introdução de espécies virais exótica no país.

28 **Palavras-chave adicionais:** *Allium sativum*, allexiviroses, *Southern Blot*, RT-PCR.

29 **ABSTRACT**

30 **Detection of *Garlic virus C* in cloves noble garlic imported**

31 The physiological and sanitary qualities of seed-cloves of garlic are preponderant factors  
32 for the obtainment of satisfactory productivity. Although the sanity of the imported garlic is  
33 not well-known, the Brazilian farmers have been using imported consumption-garlic for  
34 planting, aiming to lower the production costs. In this work, it was undertaken a sanitary  
35 analysis for detecting virus species belonging to the genus *Allexivirus*, in samples of  
36 consumption-garlic imported from Argentina, China and Spain. Total RNA extraction was  
37 performed employing the Trizol reagent, using foliar primordia obtained from dissected  
38 cloves. The cDNA synthesis and amplification were accomplished by RT-PCR, employing  
39 the pair of primers AlexU1 and AlexU2 able to detect *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic*  
40 *virus B* (GarV-B), *Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D) and *Garlic mite-*  
41 *borne filamentous virus* (GarMbFV). The products of the amplifications were analyzed in  
42 agarose gels, being verified a band in the corresponding height to 500 pb in the samples  
43 from Argentina and China. Tests of *Southern Blot* confirmed the viral infection by GarV-C.  
44 Therefore, the imported consumption-garlic does not present sanitary standards  
45 appropriated for planting and its use as seed-garlic represent a risk for introduction of  
46 exotic virus species in the country.

47

48

---

**INTRODUÇÃO**

49 O alho (*Allium sativum* L.) é uma hortaliça de grande valor econômico e social,  
50 tradicionalmente cultivada no Brasil (Filgueira, 2003). Contudo, a produção brasileira ainda  
51 não atende à demanda interna (Lucini, 2004), sendo necessário a importação do produto  
52 que em parte tem sido destinado ao uso como alho semente por agricultores (Agrianual,  
53 2003).

54 A propagação do alho é realizada via bulbilho semente, o qual apresenta uma  
55 eficiente capacidade de veiculação e disseminação de patógenos, principalmente vírus.  
56 Dentro dessa realidade, as qualidades fisiológicas e sanitárias dos bulbilhos-semente são  
57 fundamentais para o sucesso desta cultura (Torres *et al.*, 2001, Lucini, 2004). O uso de alho  
58 semente infectado por agentes virais em sucessivos plantios desencadeia um processo de  
59 degenerescência, com a perda progressiva de produtividade e qualidade do produto colhido,  
60 podendo causar redução no rendimento da cultura (Conci *et al.*, 2003).

61 O alho é hospedeiro natural de espécies virais pertencentes aos gêneros *Potyvirus*,  
62 *Carlavirus* e *Allexivirus*, sendo freqüente a detecção desses agentes em plantas de alho  
63 localizada em lavouras das principais regiões produtoras do mundo (Lunello *et al.*, 2000;  
64 Chen *et al.*, 2004). Segundo Dusi (1995), as infecções virais em alho geralmente são  
65 ocasionadas por mais de uma espécie, formando complexos virais. Na região Centro-Oeste  
66 do Brasil, Fajardo *et al.* (2001) detectou em campos de produção complexos virais  
67 formados por espécies dos gêneros *Potyvirus* (*Onin yellow dwarf virus*-OYDV e *Leek*  
68 *yellow stripe virus*-LYSV) e *Carlavirus* (*Garlic common latent virus*-GarCLV). Nesta  
69 mesma região, em estudos realizados por Melo Filho *et al.* (2004), foram detectadas as  
70 espécies *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B), *Garlic virus C* (GarV-C),  
71 *Garlic virus D* (GarV-D) e *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV). As espécies  
72 *Garlic virus E* (GarV-E), *Garlic virus X* (GarV-X) e *Shallot virus X* (ShV-X), ainda não

73 foram detectadas no Brasil; todavia, a ocorrência das mesmas tem sido relatada na China e  
74 Argentina, que são tradicionais exportadores de alho para o Brasil (Lunello *et al.*, 2000;  
75 Agriannual, 2002; Chen *et al.*, 2004). O objetivo do presente trabalho foi analisar, através de  
76 ferramentas moleculares, a sanidade do alho nobre importado, para detecção de espécies  
77 virais pertencentes ao gênero *Allexivirus*.

## 78 MATERIAL E MÉTODOS

79 No presente trabalho foram utilizados bulbos de alho nobre comercial importados da  
80 Argentina, China e Espanha, sendo estes materiais coletados na Central de Abastecimento  
81 Alimentar do Recife – CEAGEPE e armazenadas a 4 °C.

82 O RNA total, foi extraído a partir de 0,1g de fragmentos de primórdios foliares  
83 obtidos dos bulbilhos, empregando-se o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo metodologia  
84 descrita pelo fabricante.

85 As amplificações foram realizadas via RT-PCR, utilizado-se o kit “SuperScript  
86 One-step RT-PCR” (Invitrogen), empregando-se um par de oligonucleotídeos: AllexU1  
87 (5'-C-C-C-A-A-G-C-T-T-G-C-A-T-G-G-G-C-T-T-G-C-T-A-C-C-A-C-A-A<sup>3'</sup>) e AllexU2  
88 (5'-C-C-C-A-A-G-C-T-T-G-C-A-T-G-G-G-C-T-T-G-C-T-A-C-C-A-C-A-A<sup>3'</sup>), desenhados  
89 especificamente para anelar no segmento interno da capa protéica (CP) de GarV-A, GarV-  
90 B, GarV-C, GarV-D e GarMbFV, obtidos pelo alinhamento de seqüências de allexivírus  
91 depositadas no GenBank (Melo Filho, 2003). As reações de RT-PCR foram realizadas em  
92 termociclador Eppendorf (Mastercycle), programado para uma reação de transcrição  
93 reversa a 45 °C por 15 min e uma primeira desnaturação a 94 °C/2 min, seguido de 35  
94 ciclos compostos de desnaturação a 94 °C/1 min, anelamento a 53°C/1 min, extensão a 72  
95 °C/1 min e 30 seg, e um ciclo de extensão final a 72 °C/5 min. Os produtos desta reação  
96 foram analisados, em gel de agarose (0,8 %) e posteriormente transferidos para membrana

97 (Hybond-N-Nylon, Amersham Life Science®) para teste de *Southern Blot* com sonda fria,  
98 seguindo metodologia descrita em Sambrook *et al.* (1989).

99 Para obtenção da sonda fez-se uma reação de PCR, utilizando-se como molde um  
100 plasmídeo (pGEM-T) contendo o segmento interno da CP de GarV-C, cedido por Melo  
101 Filho *et al.* (2004), empregando-se oligonucleotídeos específicos, os quais produzem um  
102 fragmento de 750 pb. Para marcação da sonda, utilizou-se o kit “Bionick DNA Labeling  
103 System” (Invitrogen), onde o DNA foi marcado com biotina-14-dATP. A revelação foi  
104 procedida com uma mistura dos sais Bromo-4-Cloro-3-Indolil-Fosfato (BCIP, 50mg/mL) e  
105 Nitro Blue Tetrazólio (NBT, 75 mg/mL), na ausência de luz e à temperatura ambiente  
106 (Sambrook *et al.*, 1989).

## 107 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

108 Uma banda correspondente a 500 pb, obtida com uso dos oligonucleotídeos  
109 AlexU1 e AlexU2 foram observadas nas amostras 1 e 3, oriundas da Argentina, (Figura  
110 1A), e nas amostras 1 e 2, provenientes da China (Figura 1B). Os testes *Southern Blot*  
111 confirmaram os respectivos resultados obtidos nas análises de RT-PCR (Figuras 1C e 1D).

112 Os oligonucleotídeos AlexU1 e AlexU2 empregados na análise anelaram em  
113 regiões específicas nos materiais estudados, confirmando a presença de allexivírus, com  
114 isso, constata-se que o alho consumo importado da Argentina encontra-se infectado com a  
115 espécie GarV-C, o que corrobora com resultados obtidos por Lunello *et al.* (2000), que  
116 constatou a presença desta espécie nas principais regiões produtoras de alho da Argentina e  
117 com os encontrados por Melo Filho *et al.* (2004), que coletaram e analisaram materiais no  
118 Centro-Oeste do Brasil, constatando a ocorrência de GarV-C em lavouras de alho da região.  
119 No alho consumo importado da China foi também detectado a presença da espécie GarV-C,

120 embora este só tenha sido detectado por sorologia (informações pessoais obtidas de J. Chen  
121 em 2005), que registrou a ocorrência dessa espécie. Uma vez que a China encontra-se  
122 inserida na região de origem de várias espécies de *Allexivirus*, é possível que espécies  
123 inexistentes no Brasil, ou ainda não detectadas, possam ser introduzidas, principalmente  
124 com a continuidade da prática do uso do alho consumo importado como alho semente.

125 O uso de alho consumo, para o plantio, é uma alternativa adotada pelos produtores  
126 brasileiros (Agrianual, 2003). No entanto, sabe-se que essa prática potencializa o processo  
127 de disseminação destes agentes, que podem comprometer o pleno desenvolvimento das  
128 lavouras de alho, com uma significativa redução da capacidade produtiva (Conci *et al.*,  
129 2003).

130 A ocorrência das espécies GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E, GarV-X,  
131 GarMbFV e ShV-X têm sido registradas nas principais regiões produtoras de alho do  
132 mundo (Lunello *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Melo Filho *et al.*, 2004). Isso indica que o  
133 potencial de introdução de novas espécies no Brasil pode ser elevado a partir de importação  
134 feita de qualquer parte do mundo. Neste estudo, ficou evidente o baixo padrão sanitário do  
135 alho consumo importado, demonstrando a necessidade de uma fiscalização fitossanitária  
136 para prevenir a introdução de novas espécies virais no país. Para tanto, é necessária a  
137 utilização de metodologia de detecção de fácil execução e que apresente resultados  
138 confiáveis. Faz-se necessário também, a implementação de programas de produção de alho  
139 semente certificado, visto que o uso de bulbilho semente livre de vírus é uma das  
140 alternativas mais promissoras para o controle destes agentes (Conci *et al.*, 2003).

141

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 142 AGRIANUAL 2002: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP. Consultoria e  
143 Comércio, 2003. p.155-161
- 144 CHEN, J.; CHEN, J. & ADAMS, M.J. Molecular characterization of a complex mixture of  
145 viruses in garlic with mosaic symptoms in China. Archives of virology 146:1841-1853.  
146 2001.
- 147 CHEN, J.; ZHENG, H.Y.; ANTONIW, J.F.; ADAMS, M.J.; CHEN, J.P. & LIN, L.  
148 Detection and classification of allexiviruses from garlic in China. Archives of Virology  
149 149:435-445. 2004.
- 150 CONCI, V.C.; CANAVELLI, A. & LUNELLO, P. Yield losses associated with virus-  
151 infected garlic plants during five successive years. Plant Disease 87:1411-1415. 2003.
- 152 DUSI, A.N. Doenças causadas por vírus em alho. Informe Agropecuário 17:19-21. 1995.
- 153 FAJARDO, T.V.M.; NISHIJIMA, M.; BUSO, J.A.; TORRES, A.C. ÁVILA, A.C. &  
154 RESENDE, R.O. Garlic viral complex: indentification of potyviruses and carlavirus in  
155 central Brazil. Fitopatologia Brasileira 26:619-626. 2001.
- 156 FILGUEIRA, F.A.R. Aliáceas cebola e outros condimentos. In: FILGUEIRA, F.A.R. (Ed.)  
157 Novo manual de olericultura: a moderna tecnologia na produção de e comercialização de  
158 hortaliças. 2 ed. Viçosa: UFV, 2003. v.1, p. 252-274.
- 159 LUCINI, M.A. (Ed.) Manual prático de produção de alho. 2ª ed. Curitiba, Bayer  
160 CropScience. 2004.
- 161 LUNELLO. P.; BRAVO-ALMONACID, F.; KOBAYASHI, K.; HELGUERA, M.;  
162 NOME, S.F.; MENTABERRY, A. & CONCI, V.C. Distribution of garlic virus a in  
163 different garlic production regions of Argentina. Journal of Plant Pathology 82:17-21.  
164 2000.

165 MELO FILHO, P.A. Detecção e caracterização molecular de allxivirus e estudo de  
166 degenerescência em plantas de alho (*Allium sativum* L.) provocada por vírus. (Tese de  
167 Doutorado). Brasília. Universidade de Brasília. 2003.

168 MELO FILHO, P.A.; NAGATA, T.; DUSI, A.N.; BUSO, J.A.; TORRES, A.C.; EIRAS,  
169 M. & RESENDE, R.O. Detection of three allxivirus species infecting garlic in Brazil.  
170 Pesquisa Agropecuária Brasileira 39:735-740. 2004.

171 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. Molecular cloning – A laboratory  
172 manual, 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

173 TORRES, A.C.; DUSI, A.N.; OLIVEIRA, R. & BUSI, J.A. Produção de alho-semente com  
174 alta qualidade fitossanitária mediante cultura de ápices caulinares. Brasília. Embrapa. 2001.  
175 8 p. (Circular Técnica 27).

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189 **Figura 1.** Produtos de RT-PCR obtidos de RNA total extraído de bulbilhos de alho  
190 provenientes da: **A)** Argentina (01, 02, 03) e Espanha (04), **B)** China (01, 02 e 03):  
191 Membrana obtida a partir de *Southern blot* para os respectivos géis de eletroforese: **C)** –  
192 Argentina e Espanha e **D)** China. M: Marcador Ladder Plus (Invitrogen); S: Sonda de 750  
193 pb de GarV-C.

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

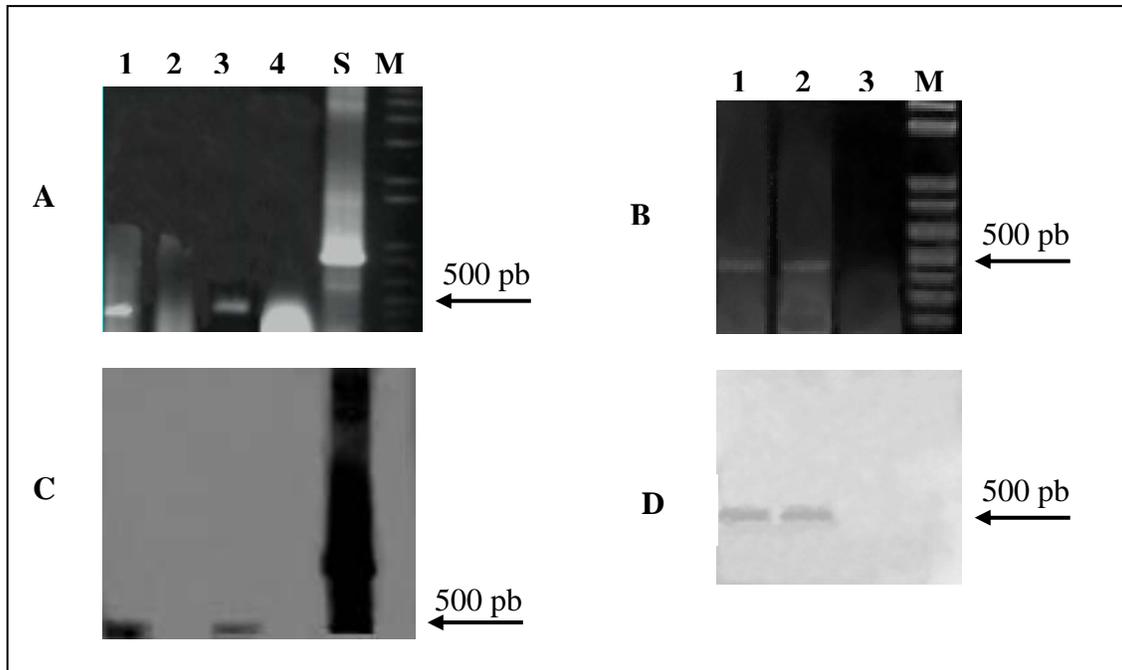
232

233

234

235

236



## **CAPÍTULO IV**

---

### **CONCLUSÕES**

## CONCLUSÕES

- A extração de RNA total obtida diretamente de primórdios foliares de bulbilhos de alho para utilização em reações de RT-PCR e hibridização, permite uma detecção rápida e precisa da presença de *Allexivírus*.
- O alho consumo importado da Argentina e da China não apresenta padrão sanitário apropriado para plantio.
- O emprego de alho consumo importado como material de plantio representa risco de introdução de espécies de *Allexivírus* no Brasil.