UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

LEVANTAMENTO DAS PRINCIPAIS VIROSES NA CULTURA DO ALHO (*Allium sativum* L.) E CARACTERIZAÇÃO DE CARLAVIRUS EM ALGUMAS REGIÕES PRODUTORAS DO BRASIL

TATIANA MITUTI

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU- SP
Agosto – 2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

LEVANTAMENTO DAS PRINCIPAIS VIROSES NA CULTURA DO ALHO (*Allium sativum* L.) E CARACTERIZAÇÃO DE CARLAVIRUS EM ALGUMAS REGIÕES PRODUTORAS DO BRASIL

TATIANA MITUTI

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan
Co-orientadora: Prof. Dra. Renate Krause Sakate

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU -SP
Agosto – 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Mituti, Tatiana, 1984-
M685l Levantamento das principais viroses na cultura do alho (*Allium sativum* L.) e caracterização de carlavirus em algumas regiões produtoras do Brasil / Tatiana Mituti. - Botucatu : [s.n.], 2009.
x, 61 f. : il., fots. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2009
Orientador: Marcelo Agenor Pavan
Co-orientador: Renate Krause Sakate
Inclui bibliografia.

1. Alho. 2. *Garlic common latent virus*. 3. *Shallot latent virus*. 4. Caracterização molecular. 5. Variabilidade genética. I. Pavan, Marcelo Agenor. II. Sakate, Renate Krause. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: **"LEVANTAMENTO DAS PRINCIPAIS VIROSES NA CULTURA DO ALHO (Allium sativum L.) E CARACTERIZAÇÃO DE Carlavirus EM ALGUMAS REGIÕES PRODUTORAS DO BRASIL"**

ALUNA: TATIANA MITUTI

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN

Aprovado pela Comissão Examinadora

PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN

PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI

PROF. DR. VALDIR ATSUSHI YUKI

Data da Realização: 28 de agosto de 2009.

DEDICO

Aos meus pais pelo incentivo, apoio e pela contribuição no meu crescimento pessoal e profissional.

OFEREÇO

Aos professores Marcelo Agenor Pavan, Renate Krause Sakate e Dr. Álvaro Almeida pela contribuição para chegar ao final de mais uma etapa; e aos meus amigos pela ajuda concedida.

"Se você abre uma porta, você pode ou não entrar em uma nova sala. Você pode não entrar e ficar observando a vida. Mas se você vence a dúvida, o temor, e entra, dá um grande passo: nesta sala vive-se! Mas, também, tem um preço... São inúmeras outras portas que você descobre. O grande segredo é saber quando e qual porta deve ser aberta. A vida não é rigorosa, ela propicia erros e acertos. Os erros podem ser transformados em acertos, quando com eles se aprende. Não existe a segurança do acerto eterno. A vida é generosa, a cada sala que se vive, descobre-se tantas outras portas, e a vida enriquece quem se arrisca a abrir novas portas. Ela privilegia quem descobre seus segredos e generosamente oferece afortunadas portas.

Mas a vida também pode ser dura e severa. Se você não ultrapassar a porta, terá sempre a mesma porta pela frente. É a repetição perante a criação, é a monotonia monocromática perante a multiplicidade das cores, é a estagnação da vida... Para a vida, as portas não são obstáculos, mas diferentes passagens!"

(Içami Tiba)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Marcelo Pavan pela orientação, amizade, ensinamentos, que contribuíram para alcançar essa etapa e por ter proporcionado as melhores condições para realização deste trabalho.

À Professora Renate Krause Sakate pela paciência, sugestões durante os trabalhos desenvolvidos, pelos conselhos e por todo conhecimento que adquiri ao longo do curso.

À UNESP/FCA pela oportunidade e apoio para o desenvolvimento do trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa e pelo financiamento do projeto.

À minha família por todo o apoio e carinho durante todas as etapas da minha vida, com certeza sem eles não teria conseguido chegar até aqui!

Minha eterna gratidão ao Dr. Álvaro Almeida que foi quem me ensinou a "dar os primeiros passos" na área da Virologia, pelos conselhos, incentivo e apoio para chegar ao final de mais uma etapa.

Ao professor Antonio Carlos Maringoni pelos ensinamentos e pela disposição em ajudar quando precisei.

Aos professores Edson Furtado, Edson Baldin, Silvia Renata S. Wilcken, Carlos Gilberto Raetano, Norberto da Silva que contribuíram para a minha formação ao longo do curso.

Aos meus amigos de laboratório que fizeram as horas de trabalho mais agradáveis: Mônika Fecury pela amizade e companhia nas horas do lanche, ao Julio Marubayashi pela ajuda na execução de alguns experimentos e pelos cafezinhos de todas as manhãs, e aos companheiros Márcio Sanches, Denise Nozaki, Kelly Rocha, Ricardo Lima e aos amigos Alexandre Visconti e Lívia Mendes.

À todos os estagiários: David Spadotti, Bruno De Marchi, Lívia Ribeiro, Hélio Umemura (Sumô), Letícia Moraes, Gerson Suzuki e Andréia de Jesus que contribuíram para o desenvolvimento de algumas etapas do trabalho.

Aos amigos do departamento Cristiane, Tadeu, Djanira, Karina, Adriana, e em especial a Martha e Juan pela convivência diária.

Aos meus irmãos do coração pelos momentos de descontração: Shigue por todos os conselhos nas horas necessárias, Eder pelas horas de gargalhada, Beto pelo apoio, Miriam por todo o carinho, a Juliana por me apoiar nos momentos de dificuldade, ao meu amigo Daniel pela companhia nas longas horas de insônia e também pelos conselhos; aos meus queridos amigos Amanda, Marcele, Hellen, Neto, Emilene e Marquinhos, que são companheiros desde a graduação e que estão sempre ao meu lado quando preciso.

Aos funcionários do departamento: Norberto, Sr. Domingos e Paulinho pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Aos produtores Isao Imaizumi e Mauro Uyeno da Empresa Genove, que auxiliaram durante as coletas; e ao Carlos Takahashi da Tecnoplanta pelos isolados enviados.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS E QUADROS IX
LISTA DE FIGURAS X
1. RESUMO 1
2. SUMMARY 3
3. INTRODUÇÃO 5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 7
4.1. A cultura do alho 7
4.2. Produção 9
4.3. Principais doenças que afetam a cultura 10
4.4. Viroses do alho 10
4.4.1. Gênero *Carlavirus* 11
4.4.1.1. Principais espécies de carlavirus 12
4.4.2. Gênero Potyvirus 13
4.4.3. Gênero Allexivirus 14
4.5. Transmissão 14
4.6. Diagnose 15
4.7. Controle 15
5. MATERIAL E MÉTODOS 17
5.1. Coleta das amostras 17
5.2. Análise das amostras 19
5.2.1. Microscopia eletrônica 19
5.2.2 Teste sorológico 19
5.2.2.1. Detecção de potyvirus 19
5.2.2.2. Detecção de *Garlic common latent virus* (carlavirus) 20
5.2.2.3. Detecção de *Shallot latent virus* (carlavirus) 20
5.2.3. Gama de hospedeiras 21
5.2.4. Caracterização molecular dos isolados 22

SUMÁRIO

Página

5.2.4.1. Extração de RNA total 22
5.2.4.2. Obtenção de oligonucleotídeos específicos para amplificação das espécies de carlavirus identificadas em alho 22
5.2.4.3. Transcrição reversa e reação de Polimerização em Cadeia (RT-PCR) 24
5.2.4.4. Análise do PCR em gel de agarose 25
5.2.4.5. Purificação do Produto de PCR 25
5.2.4.6. Clonagem 26
5.2.4.6.1. Seleção dos clones recombinantes 26
5.2.4.7. Sequenciamento 27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 28
6.1. Análise das amostras coletadas 28
6.2. Gama de hospedeiras 36
6.3. Análises moleculares 37
6.3.1. Teste de eficiência dos oligonucleotídeos 37
6.3.2. Análise da variabilidade genética dos isolados 40
7. CONCLUSÕES 47
8. REFERÊNCIAS 48
APÊNDICE 1 56
APÊNDICE 2 60
APÊNDICE 3 61

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Página

Tabela 1 – Período, localidade e número de plantas de alho sintomáticas coletadas nos períodos de maio de 2007 a julho de 2009. 18

Tabela 2 – Sequências dos oligonucleotídeos obtidos para amplificação parcial e completa da região codificadora para capa protéica de espécies de carlavírus em alho 23

Quadro 1 – Combinações de primers utilizados para a amplificação de carlavirus em alho, tamanho esperado do fragmento e região amplificada 24

Quadro 2 – Levantamento de potyvirus e carlavirus em algumas regiões produtoras do Brasil, coletados nos períodos de maio de 2007 a julho de 2009 30

Quadro 3 – Data, cultivar e local de coleta dos isolados positivos para carlavirus, testados por microscopia, ELISA e RT-PCR 31

Quadro 4 – Porcentagem de ocorrência de potyvirus e carlavirus em algumas regiões produtoras do Brasil, analisadas nos períodos de abril de 2008 a julho de 2009 35

Quadro 5 – Porcentagem de identidade de nucleotídeos (diagonal superior) e aminoácidos (diagonal inferior) correspondente a região parcial da proteína capsidial de GarCLV. 45

Quadro 6 – Porcentagem de identidade de nucleotídeos (diagonal superior) e aminoácidos (diagonal inferior) correspondente a região completa da proteína capsidial de SLV 46

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 – Organização genômica de carlavirus. As ORFs estão demonstradas pelos retângulos, e as proteínas traduzidas, pelas linhas sólidas, com suas respectivas massas moleculares (kDa)..... 12

Figura 2 – Plantas de alho coletados em campo, com sintomas de mosaico..... 17

Figura 3 – Plantas inoculadas com isolados provenientes de campo infectados com GarCLV. (A) Celosia argentea apresentando anéis cloróticos; (B) *Celosia argentea* com sintomas de mosaico; (C) *Nicotiana occidentalis* com pontos cloróticos; (D) *Chenopodium quinoa* com lesões locais..... 37

Figura 4 – Gel de agarose 0,8% com reações de RT-PCR com amostras positivas de GarCLV utilizando-se primers universais e específicos para GarCLV e SLV. (M) Marcador 1 Kb Ladder (invitrogen); (1-6) Teste com primers SLV/GCLV 7303 e SLV/GCLV 7665; (7-12) Teste com primers GCLV 7114 e SLV/GCLV 7665; (13-18) Teste com primers SLV 7303 e SLV/GCLV 7665..... 38

Figura 5 – Gel de agarose 0,8% com reações de RT-PCR de SLV utilizando primers para amplificação da região completa da proteína capsidial. (M) Marcador 1 Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen); (1) Amostra 66.1; (2) Amostra 95.2..... 39

Figura 6 – Alinhamento da sequência parcial da região da capa protéica de isolados de GarCLV..... 41

Figura 7 – Alinhamento da sequência de *Shallot latent virus*, correspondente a região completa da capa protéica. Em vermelho o códon de iniciação e em amarelo o códon de terminação da CP..... 43

Figura 8 – Árvore filogenética da sequência de nucleotídeos da porção da proteína capsidial de diferentes isolados de GarCLV e SLV. A árvore foi construída utilizando neighbor-joining, com valor de bootstrap de 2000. Potato virus M foi utilizado como outgroup..... 46

1. RESUMO

O alho é propagado através de bulbilhos, prática que favorece a perpetuação de patógenos, especialmente os vírus. Pode ser infectado por vírus pertencentes aos gêneros *Allexivirus*, *Carlavirus* e *Potyvirus*. *Garlic common latent virus* (GarCLV) e *Shallot latent virus* (SLV) são os principais carlavirus encontrados em alho no mundo.

No Brasil, existem poucas informações sobre as espécies de carlavirus ocorrendo em alho, de modo que os objetivos do trabalho foram realizar levantamento visando determinar a ocorrência de carlavirus em algumas regiões produtoras do País, caracterizar e identificar através de técnicas biológicas e moleculares os isolados obtidos.

Novecentas e dezenove amostras foram coletadas nos estados de São Paulo, Paraná, Goiás e Minas Gerais. Através do teste de ELISA, 560 foram positivas somente para potyvirus, 53 verificou-se a infecção pelo complexo entre GarCLV e potyvirus, sete foram positivas para SLV e potyvirus, duas positivas para GarCLV e uma para SLV. Cento e oito amostras foram negativas para os testes realizados.

Alguns isolados de GarCLV foram inoculados mecanicamente, utilizando extrato vegetal, em plantas de *Chenopodium amaranticolor*, *Celosia argentea*, *C. murale*, *C. quinoa*, *Nicotiana occidentalis, Gomphrena globosa*, *Allium tuberosum* (cebolinha japonesa), *Allium porrum* (alho-porro) e *Allium fistulosum* (cebolinha). A presença de anéis cloróticos e mosaico foram observados em plantas de *Celosia argentea,* pontos cloróticos em *Nicotiana occidentalis* e lesões locais em *Chenopodium quinoa*.

Os oligonucleotídeos universais e específicos para GarCLV foram eficientes para detecção de vírus. Quatorze isolados foram sequenciados, indicando se tratar de isolados de GarCLV. A identidade de nucleotídeos entre os isolados de GarCLV foram de 87% a 97% comparadas com sequências depositadas no GenBank. Pela primeira vez no Brasil, foi detectado a presença do SLV em amostras provenientes de São Manuel (SP) e Piraquara (PR), onde a identidade de nucleotídeos foram de 90% e 99%, com isolados de SLV depositados no GenBank, números de acessos AB004567, DQ520093 and AB004802.

Diante dos resultados, conclui-se que há baixa ocorrência de carlavirus em alho, quando comparados aos de potyvirus. A variabilidade genética entre os isolados analisados evidenciou a possível entrada de bulbos de alho oriundos de diferentes regiões geográficas do mundo.

Palavras-chaves: Alho; *Garlic common latent virus*; *Shallot latent virus*; Diagnose; Gama de hospedeiro; Caracterização molecular; Sequenciamento; Variabilidade.

SURVEY FOR THE MOST IMPORTANT VIRUS INFECTING GARLIC (*Allium sativum* l.) AND CHARACTERIZATION OF CARLAVIRUS DETECTED IN SOME PRODUCING AREAS OF BRAZIL

Author: Tatiana Mituti

Adviser: Marcelo Agenor Pavan

Co-Adviser: Renate Krause Sakate

2. SUMMARY

Garlic is propagated by bulbs, practice that favors the transmission of pathogens, especially viruses. Garlic can be infected by viruses belonging to the genus *Allexivirus*, *Carlavirus* and *Potyvirus*. *Garlic common latent virus* (GarCLV) and *Shallot latent virus* (SLV) are the most important carlavirus species infecting garlic around the world.

In Brazil there is no information about the species of carlavirus occurring in garlic, so the objective of this work was to evaluate the occurrence of carlavirus in some producing regions of Brazil and to identify and characterize the isolates by molecular and biological techniques.

Nine hundred and nineteen samples were collected in the states of São Paulo, Paraná, Goiás and Minas Gerais. Through the ELISA test, 560 were positive for the presence of potyvirus, 53 were infected with GarCLV and potyvirus, seven were infected with SLV and potyvirus, two by GarCLV, and one for SLV. One hundred and eight samples were negative for the presence of viruses.

Some GarCLV isolates were inoculated by sap transmission on *Chenopodium amaranticolor*, *Celosia argentea*, *C. murale*, *C. quinoa*, *Nicotiana occidentalis, Gomphrena globosa*, *Allium tuberosum Allium porrum* and *Allium fistulosum*. The presence of rings spots and mosaic were observed on *Celosia argentea*, chlorotic spots on *Nicotiana occidentalis* and chlorotic local lesions on *C. quinoa*.

The universal oligonucleotides for carlavirus and the specifics for GarCLV were efficiently used for the detection of the viruses. Fourteen isolates were sequenced, indicating the presence of GarCLV species. The identity of nucleotides between the GarCLV isolates was of 87% to 97% compared to the sequences deposited in GenBank. SLV was detected for the first time in Brazil on samples collected in São Manuel and Piraquara. The nucleotide identity of the complete CP sequence was of 90% to 99% compared to the sequences deposited in GenBank, access number AB004567, DQ520093 and AB004802

The results indicates low occurrence of carlavirus in garlic as compared to the potyvirus and the possible entry of garlic bulbs from different geographical regions of the world.

Key-words: Garlic; *Garlic common latent virus*; *Shallot latent virus*; Diagnose; Host range; Molecular characterization; Sequencing; Variability.

3. INTRODUÇÃO

O alho é uma monocotiledônea, pertencente à família Alliaceae, cujo órgão de armazenamento, classificado como bulbo, é a parte comercial da planta. Sob condições climáticas favoráveis, as gemas do caule desenvolvem-se formando cada uma um bulbilho, que em seu conjunto formam o bulbo (MENEZES SOBRINHO, 1978).

Esta cultura é muito exigente em fotoperíodo e temperatura para o seu completo desenvolvimento, sendo as regiões Sul e Sudeste do país as mais propícias para o seu cultivo, pois temperaturas inferiores a 15 ºC no inverno estimulam a formação do bulbo (MENEZES SOBRINHO *et al.*, 1993).

O alho é propagado de forma vegetativa, propiciando o acúmulo de patógenos, especialmente os vírus, que são perpetuados pelos bulbos de um ciclo de produção para outro. Normalmente, o alho encontra-se infectado por uma mistura de vírus filamentosos pertencentes aos gêneros *Allexivirus*, *Carlavirus* e *Potyvirus* (FAJARDO *et al*., 2001). Dentre os carlavirus o mais comumente encontrado é o *Garlic common latent virus* (GarCLV), com relatos na Ásia, Europa, América do Norte e inclusive no Brasil (FAJARDO *et al*., 2001) e também o *Shallot latent virus* (SLV) (VAN DIJK, 1993), ainda não relatado no Brasil. O Garlic mosaic virus ainda é considerado uma espécie tentativa no gênero (ADAMS *et al*., 2005). Na Argentina verificou-se ocorrência de um carlavirus com propriedades semelhantes ao *Carnation latent virus* (CLV) (CONCI *et. al*., 1992).

Os sintomas típicos observados em folhas de alho são estrias de cor verdes claro ou amarelas, conhecidas como “mosaico do alho”, e geralmente os vírus

detectados em alho não ocasionam morte das plantas e convivem com ela de forma crônica, perpetuando-se através de distintos ciclos de cultivo, ajudado pela natureza agâmica da espécie (PAVAN, 1998).

A detecção de vírus em alho no Brasil ainda se baseia na utilização do ELISA-indireto utilizando antissoro policlonal contra potyvirus e carlavirus, não identificando a espécie viral presente. Como há poucos estudos referentes às espécies de carlavirus infectando alho no Brasil, os objetivos deste trabalho foram realizar levantamento visando observar a ocorrência de carlavirus e potyvirus nas diferentes regiões produtoras do Sul e Sudeste do País; caracterizar e identificar os isolados de carlavirus através de técnicas biológicas e moleculares.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. A cultura do alho

O alho pertence à família Liliaceae, do gênero *Allium*, da espécie *Allium sativum* L., é uma espécie herbácea, e dependendo da cultivar, pode atingir até 60 centímetros de altura (MENEZES SOBRINHO, 1978). A parte utilizável é o bulbo, composto por bulbilhos, rico em amido e substâncias aromáticas, com valor condimentar, medicinal e nutricional. Cada bulbilho contém uma gema capaz de originar uma nova planta após a brotação, e é uma planta que se comporta como uma cultura anual, apresentando apenas a etapa vegetativa do ciclo biológico (FILGUEIRA, 2007).

De acordo com Menezes Sobrinho (1978), é uma espécie que se cultiva há muitos séculos, tendo como centro de origem as Zonas Temperadas da Ásia Central, de onde se espalhou para a região do Mediterrâneo, e acredita-se que o alho cultivado hoje no Brasil tenha vindo do México, Egito e de alguns países da América do Sul.

O alho tem uma inflorescência umbeliforme, com flores que portam 6 sépalas, 6 estames, um estigma e um fruto em cápsula que contém as sementes. No Brasil, a inflorescência é de aspecto vegetativo em variedades que emitem escarpo floral (FILGUEIRA, 1972).

Peña-Iglesias (1988), citado por Pavan (1998), descreve que o único lugar onde o alho floresce naturalmente é na China, e para isto são necessários vários fatores

ao mesmo tempo, tais como, bulbos formados de tamanho regular, submetidos a frio prolongado, seguidos de dias frescos, abaixo de 20 °C e fotoperíodo curto.

Para que ocorra a formação dos bulbos, é necessário que haja interação entre fotoperíodo, temperatura e cultivar. As épocas de plantio podem variar de região para região, devido às diversidades climáticas. Em Minas Gerais, por exemplo, recomenda-se o plantio nos meses de fevereiro a março, já em São Paulo as épocas ideais são os meses de março a abril (MÜLLER e SILVA, 1983).

As temperaturas médias mensal mais indicadas para o bom desenvolvimento das plantas variam de 24 °C, e para formação dos bulbos as temperaturas exigidas são de aproximadamente 13 °C, sendo que na falta dessas temperaturas não haverá formação dos bulbos, mesmo sob dias longos (MASCARENHAS, 1978). Na fase de amadurecimento dos bulbos, um clima seco e quente é mais favorável (FILGUEIRA, 2007).

Segundo Filgueira (2007), a produção de cultivares tardias no centro-sul era impedida devido ao fotoperíodo e temperaturas inadequadas, porém para resolver esse problema, pesquisadores brasileiros adaptaram a técnica da vernalização pré-plantio, que consiste em manter os bulbos a uma temperatura de 3 °C a 4 °C, durante 40 a 55 dias, sendo os bulbos retirados das câmaras às vésperas do plantio.

Após a colheita, o alho encontra-se em período de dormência (WRIGHT e PEACOCK, 1934, apud PAVAN, 1998). Se for semeado logo após a colheita, não ocorrerá a germinação. A duração de dormência pode ser mais ou menos longa, dependendo da cultivar e das condições ambientais, principalmente, da temperatura em que os bulbos forem mantidos (BURBA, 1983).

Essa cultura possui propriedades medicinais cientificamente comprovadas, com efeitos benéficos sobre o organismo humano, tais como, ação revigorante, aumentando a capacidade de resistência, no caso de gripes e resfriados, possui efeito antibiótico, ação estimulante contribuindo para o bom funcionamento do estômago, do intestino, entre outras. Todos os efeitos benéficos do alho variam conforme o preparo e sua conservação (FROSI e YOKOYAMA, 1983).

4.2. Produção

Até o ano de 1979 o Brasil importava por ano, 33 mil toneladas de alho de 21 países, e a produção brasileira era de apenas 8 mil toneladas. Somente a partir da década de 80 a produção começou a ser significativa, devido a criação do Programa Nacional do Alho (PRONALHO), onde houve uma política de crédito diferenciado para a compra de sementes, quotas para as importações e garantia de preços mínimos. Esse estímulo permitiu aumentar constantemente o plantio (REGINA, 1986).

De acordo com Agrianual (2008), atualmente o Brasil tem uma produção de aproximadamente 84 mil toneladas, em uma área de 10 mil hectares. Isto permite concluir que o país necessitará importar um volume superior a 100 mil toneladas anuais do produto.

Considerando que nos anos entre 1974 e 1975 o consumo anual de alho no Brasil foi estimado em 372 gramas por habitante (MAKISHIMA, 1982, apud SILVA *et al.,* 1983), e atualmente o consumo praticamente triplicou, passando para 1,1 Kg/habitante por ano (ANAPA, 2009), desta forma o país necessitou aumentar a importação, quando comparado a década de 70, a fim de garantir a normalidade do abastecimento interno. O alho é proveniente principalmente da Argentina e da China.

O principal produtor de alho nacional é o estado de Minas Gerais. Na safra de 2007, produziu aproximadamente 24 mil toneladas, ou seja, cerca de 30% da produção brasileira. Seguem, em ordem crescente de participação, os estados de Goiás, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, representando aproximadamente 13,4%, 13,7% e 24,8%, respectivamente (AGRIANUAL, 2008).

De acordo com Filgueira (2007), as cultivares mais plantadas dependem das regiões onde serão cultivadas, e são divididas em três grupos:

a) Cultivares precoces (Branco Mineiro e Cateto Roxo) têm um ciclo de apenas quatro meses, são menos exigentes quanto a fotoperíodo e frio, com adaptação ao cultivo em regiões com latitudes diferenciadas, porém são cultivares com baixo valor comercial;

b) Cultivares de ciclo mediano (Lavínia e Amarante) possuem ciclo superior a cinco meses, são um pouco mais exigentes em fotoperíodo e frio, com adaptação regional mais restrita, apresentam bulbos graúdos com melhor cotação comercial;

c) Cultivares tardias, conhecidas como alho nobre, como por exemplo as cultivares Chonan, Roxo-Pérola-de-Caçador e Quitéria, apresentando ciclos longos, de seis meses ou mais, exigentes em fotoperíodo (13 horas) e frio, produzindo bulbos no extremo sul, ou então podendo ser plantadas no centro-sul aplicando-se vernalização. Possuem alta cotação comercial, devido a qualidade, comparável ao alho argentino.

4.3. Principais doenças que afetam a cultura

Dentre as doenças importantes, estão as causadas por fungos: mancha púrpura (*Alternaria porri),* podridão branca (*Sclerotium cepivorum*) e ferrugem do alho (*Puccinia allii*) (MASSOLA *et al.,* 2005). A principal doença causada por bactéria é a queima bacteriana do alho (*Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*) (ROBBS *et al.,* 1981*,* apud ROMEIRO, 2000), por nematóide: nematóide da haste e do bulbo ou amarelão do alho, causada por *Ditylenchus dipsaci* (LORDELLO, 1979 apud BECKER, 2000).

Segundo Massola e colaboradores (2005), dentre os vírus mais estudados, estão algumas espécies do gênero *Potyvirus* pertencente à Família *Potyviridae*, *Carlavirus* e *Allexivirus* da família *Flexiviridae*. Os patógenos, principalmente os vírus, são disseminados e perpetuados em plantios sucessivos, acarretando degenerescência, uma vez que as cultivares de alho plantadas no Brasil e em vários países do mundo, estão infectadas por um ou mais vírus (CARVALHO, 1986).

4.4. Viroses do alho

Devido à propagação vegetativa do alho, há um aumento gradativo na incidência de vírus, capaz de reduzir consideravelmente o rendimento da cultura, afetando possivelmente, a viabilidade dos bulbilhos armazenados (CARVALHO, 1986; FAJARDO, 1998).

Segundo Carvalho (1981), cultivares infectadas parecem constituir a regra geral nos plantios comerciais da França, Itália, Holanda e de outros países Europeus, assim como no Brasil, Estados Unidos, Argentina e Uruguai, sendo comum a ocorrência de

dois ou mais vírus de diferentes grupos taxonômicos (BARG *et al.,* 1994; CONCI *et al.,* 1992; FAJARDO *et al.,* 2001; TSUNEYOSHI *et al.,* 1998).

Os sintomas não auxiliam na identificação do vírus, pois a infecção por vírus de diferentes espécies induz sintomas foliares semelhantes, e são mais evidentes em folhas jovens (DUSI, 1995). Os sintomas são mais intensos quando há a infecção pelo complexo entre potyvirus e carlavirus, enquanto que a infecção somente com carlavirus induz sintomas mais atenuados (TAKAICHI *et al.,* 1998).

4.4.1. Gênero *Carlavirus*

O gênero *Carlavirus* pertence à família *Flexiviridae*, onde engloba mais sete outros gêneros: *Potexvirus, Mandarivirus, Allexivirus, Foveavirus, Capillovirus, Vitivirus* e *Trichovirus* (ADAMS *et al.,* 2005).

Os vírus possuem partículas alongadas e flexuosas, entre 610 a 700 nm de comprimento e 12 a 13 nm de diâmetro (KOENIG, 1982 apud, PAVAN, 1998), que são constituídos por um genoma de RNA fita simples positivo (ssRNA) de 8,3 a 8,6 kb de comprimento. O membro tipo é o *Carnation latent virus* (CLV). A transmissão ocorre por propagação vegetativa, por inoculações via extrato vegetal e a maioria das espécies deste gênero são transmitidos por afídeos de maneira não persistente, mas alguns são por mosca-branca, ocorrendo majoritariamente em regiões subtropicais (ADAMS *et al*., 2005).

O genoma é composto por 6 ORFs ("open reading frame" ou fase aberta de leitura), como demonstra a Figura 1. A ORF1 codifica uma proteína de 223 kDa correspondente a replicase, as ORFs 2, 3 e 4 formam o TGB (triple gene block). A ORF5 corresponde à capa protéica. A ORF 6 codifica uma proteína de 11-16 kDa porém com função ainda não definida, talvez seja responsável pela facilidade de transmissão por afídeos, ou envolvida na replicação do RNA, ou ainda responsável pelo silenciamento gênico. Estudos detalhados são necessários para desvendar a sua função (ADAMS *et al*., 2005).

O TGB é uma região conservada de genes que estão envolvidos no movimento célula-célula e movimento do vírus a longa distância, que é constituído pelo TBG1 responsável pelo aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas, e o TGB2 e TGB3 pela

condução do complexo via retículo endoplasmático ou citoesqueleto, até os plasmodesmas (ZERBINI *et al.,* 2006).

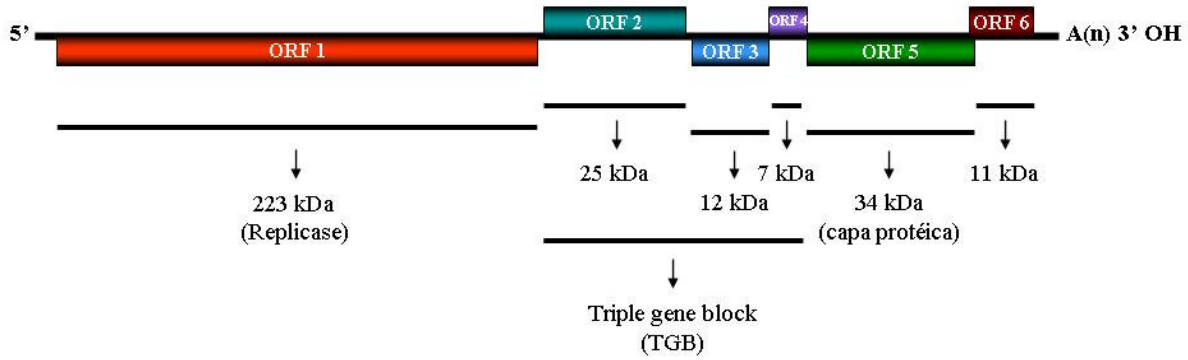

Figura 1 – Organização genômica de carlavirus. As ORFs estão demonstradas pelos retângulos, e as proteínas traduzidas, pelas linhas sólidas, com suas respectivas massas moleculares (kDa).

4.4.1.1. Principais espécies de carlavirus

Dentre os carlavirus, os mais comumente encontrados em alho, são o GarCLV e o SLV.

A espécie GarCLV foi corretamente descrita por Van Dijk (1993), com relatos na França (DELECOLLE e LOT, 1981, apud VAN DIJK, 1993), Alemanha (GRAICHEN e LEISTNER, 1987, apud VAN DIJK, 1993), Holanda (VAN DIJK, 1993) e Brasil (DANIELS, 1999; FAJARDO *et al*., 2001). GarCLV não é endêmico no Japão, Taiwan e na Tailândia (BARG *et al.*, 1994). A sequência do genoma completo de GarCLV contém 8.353 nucleotídeos (ADAMS *et al.*, 2005).

A outra espécie ocorrente é o SLV, identificado pela primeira vez na Holanda, em plantas de chalota (*Allium cepa* var. *ascalonicum*) (BOS *et al.,* 1978), ocasionalmente encontrados em alho-porró (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) e cebola (*Allium cepa*) na Holanda e Dinamarca (VAN DIJK, 1993). Em plantas de alho foi identificado pela primeira vez na Inglaterra (WALKEY *et al.,* 1987). Até o momento não há relato dessa espécie no Brasil.

Garlic latent virus (GarLV) era considerado uma estirpe do SLV (VAN DIJK, 1993; TSUNEYOSHI *et al.*, 1998), entretanto atualmente, de acordo com o 8° Relatório do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, GarLV é considerado a mesma espécie de SLV (VAN DIJK, 1993; ADAMS *et al*., 2005).

Na Argentina verificou-se ocorrência de um carlavirus com propriedades semelhantes ao *Carnation latent virus* (CLV) (CONCI *et. al*., 1992), detectado também por Mavric e Ravnikar (2005) na Eslovênia, em plantas de alho em infecção mista com GarCLV. Não foi possível separá-lo biologicamente do GarCLV, e a autora afirma que é possível que essa espécie seja dependente deste vírus para replicação ou movimento do vírus na planta. Dusi e colaboradores (1994) verificaram uma incidência de 64% de CLV, em levantamento realizado nas cultivares Quitéria, Amarante, Gigante e Caçador, provenientes dos estados do Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás e Santa Catarina.

4.4.2. Gênero Potyvirus

Os vírus pertencentes a este gênero têm como característica partículas com forma filamentosa flexuosa, tamanho variando entre 720 a 900 nm por 11 de diâmetro, e a formação de inclusões típicas conhecidas como cata-vento (HOLLINGS e BRUNT, 1981).

As espécies de potyvirus mais frequentemente encontradas são *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) e *Leek yellow stripe virus* (LYSV) (MAESO *et al.,* 1997; CHEN *et al.,* 2001; KLUKACKOVÁ *et al.,* 2007) com relatos no sul e sudeste da Ásia (BARG *et al.,* 1994), Itália (BELLARDI *et al.,* 1995), Venezuela (MARYS *et al.,* 1994), França (MESSIAEN, 1994), Japão (TAKAICHI *et al.,* 1998) e também no Brasil (DUSI, *et al.,* 1994; DANIELS, 1999; FAJARDO *et al.,* 2001). As espécies de potyvirus são as mais frequentemente detectadas, e as que mais têm causado prejuízos em alho (SALOMON, 2002).

De acordo com Walkey e Antill (1989), quando há infecção isolada somente com a espécie OYDV, pode ocorrer perdas na produção de bulbos de até 50%.

4.4.3. Gênero Allexivirus

O terceiro grupo de vírus em alho pertence a Família *Flexiviridae* (ADAMS *et al.,* 2005) e a transmissão ocorre através de ácaros. Poucas pesquisas têm sido realizadas com esse grupo, pois eles não foram completamente isolados e identificados, devido a sua baixa incidência no campo (ARSHAVA *et al.,* 1995).

As espécies desse gênero possuem partículas de 800 nm de comprimento e 12 nm de diâmetro. O membro tipo do gênero é o *Shallot virus X.* A fita simples de RNA possui aproximadamente 9.0 Kb e o genoma é composto de 6 ORFs, possui TGB similares aos carlavirus, porém a terceira proteína codificadas pelo TGB não tem homologia com nenhuma outra proteína conhecida, sendo uma das características que difere um grupo do outro (ADAMS *et al.,* 2005).

A distribuição do vírus está na Rússia, Japão, França, Alemanha, Holanda, Korea, Taiwan, Argentina e no Brasil, segundo trabalho publicado por Melo Filho e colaboradores (2004). As espécies já descritas no Brasil são: *Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D) e *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV).

4.5. Transmissão

Os afídeos, conhecidos como pulgões, possuem aparelho bucal do tipo sugador, e são considerados os mais importantes insetos vetores, transmitindo cerca de 275 espécies de vírus. Tanto carlavirus como potyvirus, a relação vírus-vetor é do tipo não persistente (VAN DIJK, 1993), ou seja, em poucos segundos esses insetos adquirem os virus ao se alimentarem em plantas infectadas, introduzindo os estiletes nas células do mesófilo (picada de prova), e em seguida já são capazes de transmitir, ao se alimentarem em uma planta sadia (HULL, 2001).

As espécies de afídeos já encontradas colonizando a cultura de alho são *Myzus persicae*, *Aphis* spp., *Brevicoryne brassicae* (SOSA *et al.,* 1997), *Neotoxoptera* sp. (Theobald) (MELO FILHO *et al.*, 2000; MELO FILHO *et al.*, 2002) e *Neotoxoptera formosana* (MELO FILHO *et al.,* 2005).

4.6. Diagnose

A gama de hospedeiras de um vírus consiste na variedade de hospedeiros que o vírus pode infectar. No caso do alho, os vírus são em geral restritos à família Alliaceae, sendo estas consideradas indicadoras pouco eficientes para detecção (PAVAN, 1998).

De acordo com experimentos realizados por Van Dijk (1993), os carlavirus provenientes de alho, inoculados mecanicamente, podem causar sintomas nas espécies de *Celosia argentea* var. plumosa, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium murale*, *Chenopodium quinoa* e *Nicotiana occidentalis*.

A sorologia é um outro método que vem sendo empregada eficientemente para a diagnose de vírus em alho, sendo que vários centros de pesquisa produzem antissoro para esses vírus ou existem antissoros comerciais disponíveis para as espécies de carlavirus (GarCLV e SLV), bem como antissoro anti-potyvirus da Agdia. Somente não há disponibilidade comercial de antissoro contra os allexivirus.

Através do desenvolvimento das técnicas da biologia molecular foi iniciada uma nova era da pesquisa na área da fitopatologia. Para os vírus em alho já existem alguns oligonucleotídeos disponíveis na literatura, como os de Takaichi e colaboradores (1998) para amplificação da região codificadora para a proteína capsidial de carlavirus, os de Tsuneyoshi e colaboradores (1998) específicos para o SLV e GarCLV.

Além do PCR tradicional, o PCR quantitativo já foi empregado para detecção do OYDV e LYSV, mostrando-se de 60 a 70% mais eficiente quando comparados com o teste de ELISA (LUNELLO *et al*., 2004).

4.7. Controle

Diversas metodologias têm sido empregadas no controle dos vírus em alho, dentre elas a associação de termoterapia e cultura de tecido, indexação para os principais vírus e propagação controlada para obtenção de material básico de alta qualidade sanitária para multiplicações posteriores (PAVAN, 1998).

Trabalhos desenvolvidos por Fajardo e colaboradores, mostram que cultivares de alhos livre de vírus têm melhor desempenho, em relação à mesma cultivar originária de propagação convencional, naturalmente infectada por vírus. As plantas livres de vírus apresentam-se mais vigorosas (maiores altura de planta e número de folhas), e em consequência, os bulbos colhidos são maiores, aumentando a produção, o peso médio de bulbo e o rendimento da cultura. A produtividade do alho infectado e livre de vírus foi estimada, respectivamente, em 4,13 e 10,48 t/ha. Os resultados obtidos demonstraram aumento de até 130,17% (19,32 g para 44,47 g) no peso médio do bulbo, quando se empregou no plantio o alho-semente livres de vírus.

Pavan (1998) sugere uma alternativa viável, com menor custo, maior capacidade de aclimatização, maior produtividade e melhor qualidade dos bulbos através da utilização de clones assintomáticos selecionados no campo de produção, pois foi possível observar um ganho significativo no rendimento quando feito essa seleção visual, devido a resistência ou tolerância do tecido que alguns clones têm à infecção viral, principalmente para a cultivar Quitéria.

O inseto vetor transmite o vírus em poucos segundos, desta forma a pulverização com inseticidas para controlar vetores, praticamente não têm efeito no controle, pois a transmissão poderá ocorrer antes que o afídeo morra em decorrência da ingestão do inseticida (SATURNINO e CRUZ FILHO, 1980).

A associação de praticas culturais é necessário para favorecer o pleno desenvolvimento da planta, bem como reduzir a disseminação de viroses no campo, e consequentemente, menor infecção do cultivo. As práticas mais eficientes utilizadas são evitar plantios sucessivos, evitar culturas novas próximo às velhas, realizar o controle de plantas daninhas hospedeiras de afídeos e eliminar restos de culturas contaminados (DUSI, 1995).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Coleta das amostras

Foram realizadas 26 coletas em quatro Estados: Paraná (Bandeirantes, Piraquara e Guarapuava), São Paulo (São Manuel), Goiás (Campo Alegre e Ipameri) e Minas Gerais (Santa Juliana e São Gotardo), nos períodos de maio de 2007 a julho de 2009 (Tabela 1). As plantas coletadas apresentavam estrias de cor verde claro ou amarelo (Figura 2), e foram analisadas no Laboratório de Virologia da FCA/ Depto. de Produção Vegetal da UNESP – Botucatu.

Figura 2 – Plantas de alho coletados em campo, com sintomas de mosaico.

As amostras coletadas da região de Guarapuava/PR e Piraquara (região Metropolitana de Curitiba/PR) foram obtidas de alho, cujos bulbilhos foram provenientes de cultura de tecido e cultivadas em estufas protegidas com telas anti-afídeo. As demais amostras coletadas foram provenientes de campos de produção comercial.

As amostras positivas para carlavirus foram preservadas na forma de dessecado (BOS, 1994), armazenadas em frascos de vidro contendo ⅓ de cloreto de cálcio anidro granulado ($CaCl_2$), com um pequeno pedaço de algodão sobre o cloreto de cálcio, de modo a evitar o contato das amostras diretamente com o reagente. As folhas foram cortadas em pequenas tiras e colocadas sobre o algodão e armazenadas a 4 °C.

Tabela 1 – Período, localidade e número de plantas de alho sintomáticas coletadas nos períodos de maio de 2007 a julho de 2009.

Coletas	Períodos de coletas	Localidade	Nº de plantas coletadas
1	Maio de 2007	Santa Juliana / MG	86
2	Maio de 2007	Campo Alegre / GO	5
3	Maio de 2007	Bandeirantes / PR	4
4	Maio de 2007	Ipameri / GO	6
5	Maio de 2007	São Gotardo / MG	5
6	Junho de 2007	Santa Juliana / MG	9
7	Junho de 2007	Ipameri / GO	6
8	Junho de 2007	Campo Alegre / GO	9
9	Julho de 2007	São Manuel / SP	18
10	Agosto de 2007	São Manuel / SP	30
11	Setembro de 2007	Guarapuava / PR	6
12	Setembro de 2007	Santa Juliana / MG	4
13	Abril de 2008	Santa Juliana / MG	10
14	Abril de 2008	Ipameri / GO	20
15	Maio de 2008	Santa Juliana / MG	13
16	Maio de 2008	São Manuel / SP	1
17	Junho de 2008	Santa Juliana / MG	31
18	Julho de 2008	São Manuel / SP	37
19	Julho de 2008	Santa Juliana / MG	88
20	Agosto de 2008	Santa Juliana / MG	8
21	Setembro de 2008	Guarapuava/PR	116
22	Outubro de 2008	Piraquara/PR	131
23	Outubro de 2008	Guarapuava / PR	20
24	Maio de 2009	Santa Juliana/MG	206
25	Maio de 2009	Campo Alegre/GO	8
26	Julho de 2009	São Manuel / SP	42
	Total		**919**

5.2. Análise das amostras

5.2.1. Microscopia eletrônica

Para a identificação de carlavirus inicialmente se utilizou a técnica de imersão rápida foliar (*Leaf Dip*). As amostras coletadas foram analisadas ao microscópio eletrônico para observação da morfologia das partículas de vírus presentes nas amostras de alho com sintomas. As folhas foram trituradas com tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 contendo 0,01 M de sulfito de sódio e contrastadas com acetato de uranila 3% durante 5 minutos, segundo metodologia de Kitajima (1965). A observação foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão Phillips CMV-100 do Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária da UNESP/FCA de Botucatu.

Essa técnica de análise foi utilizada até a 12° coleta, totalizando 188 amostras analisadas.

5.2.2 Teste sorológico

Para auxiliar na detecção de vírus nos materiais coletados em campo, bem como verificar a presença de infecção mista, foram utilizados os antissoro policlonal universal anti-potyvirus e específicos para carlavirus (anti-*Garlic common latent virus* e anti-*Shallot latent virus* - Agdia), onde 731 amostras foram testadas por ELISA (Enzyme linked immunosorbert assay) (CLARCK e ADAMS, 1977).

5.2.2.1. Detecção de potyvirus

Na detecção de potyvirus foram utilizados o teste de ELISA-indireto, onde inicialmente as amostras foram maceradas em tampão de extração Indirect Sample Extraction (1,59 g de Na_2CO_3, 2,93 g de $NaHCO_3$, 0,2 g de NaN_3, 20 g de Polyvinylpyrrolidona (PVP) dissolvidos em 1000 mL de água destilada), 100 µL do macerado foi adicionado às cavidades das placas e incubado por 2 horas em temperatura ambiente. A

placa foi lavada por 7 vezes em tampão PBS-Tween (NaCl (8,0g), Na_2HPO_4 (1,5 g), KH_2PO_4 (0,2 g), KCl (0,2 g), Tween 20 (500 µL) dissolvidos em 1000 mL de água destilada obtendo uma solução final com pH 7.4), seguido da adição do anticorpo, diluído (1:200) em ECI Buffer (20 g de Polyvinylpyrrolidona (PVP), 2,0 g de albumina bovina, 0,2 g de NaN_3) e incubado por 16 horas a 4 °C, seguido de lavagem por 7 vezes em tampão PBS-Tween. Em seguida adicionou-se o conjugado, diluído em ECI Buffer (1:200), e incubado por 2 horas, seguido de lavagem por 7 vezes em tampão PBS-Tween. A revelação foi feita utilizando a enzima p-nitrofenilfosfato (1,0 mg/mL) diluído em 5 mL de tampão Tris 0,2 M (Sigma). Após 60 minutos, a leitura da placa foi efetuada em leitor automático de microplaca, em absorbância de 405 nm. Foram consideradas amostras positivas os valores que apresentaram 3 vezes maior que o controle negativo.

5.2.2.2. Detecção de *Garlic common latent virus* (carlavirus)

Para este teste, foi realizado o Double Antibody Sandwich-ELISA (DAS-ELISA). Foram adicionados em cada pocinho, 100 µL de anticorpo, diluído 1:200 em tampão carbonato (1,59 g de Na_2CO_3, 2,93 g de $NaHCO_3$, 0,2 g de NaN_3, em 1.000 mL de água destilada), e incubado por 4 horas a temperatura ambiente, seguido de 3 lavagens da placa com PBS-Tween. As amostras testadas, foram maceradas em General extract buffer (1,3 g de Na_2SO_3, 20 g de Polyvinylpyrrolidona (PVP), 0,2 g de NaN_3, 2,0 g albumina de ovo de galinha, 20 mL de Tween-20, dissolvidos em 1.000 mL de PBS-Tween) e 100 µL do macerado foi adicionado em cada pocinho e incubado por 16 horas à 4 °C. A placa foi lavada novamente com PBS-Tween por 8 vezes, e em seguida adicionou-se o conjugado, diluído em tampão ECI (1:200), e incubado por 2 horas, seguido de lavagem por 8 vezes. A revelação e leitura da placa foi realizada como descrito no item 5.2.2.1.

5.2.2.3. Detecção de *Shallot latent virus* (carlavirus)

Para este teste, foi realizado o DAS-ELISA. Foram adicionados em cada pocinho, 100 µL de anticorpo, diluído 1:200 em tampão carbonato, e incubado por 4 horas a temperatura ambiente, seguido de 3 lavagens da placa com PBS-Tween. As amostras

testadas, foram maceradas em General extract buffer e 100 µL do macerado foi adicionado em cada pocinho e incubado por 16 horas à 4 °C. A placa foi lavada novamente com PBS-Tween por 8 vezes, e em seguida adicionou-se o conjugado, diluído (1:200) em tampão 1X MRS (Agdia), e incubado por 2 horas, seguido de lavagem por 8 vezes. A revelação foi feita utilizando TMB peroxidase substrate solution 1X (Sigma). Após 20 minutos, a placa foi analisada visualmente observando-se presença de coloração azul (resultado positivo).

5.2.3. Gama de hospedeiras

Para que fosse possível a avaliação da gama de hospedeira somente para carlavirus, foi necessário primeiramente encontrar uma hospedeira que fosse capaz de separar as espécies de carlavirus e potyvirus.

Para a multiplicação somente de carlavirus, plantas de *Celosia argentea* foram inoculadas com isolados positivos, testados previamente por RT-PCR, que estavam preservados na forma de dessecado. Para macerar o tecido utilizou-se tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 8.0 e como abrasivo o carborundum (600 mesh). Após inoculação as plantas foram lavadas e mantidas em casa-de-vegetação.

Utilizando plantas de *Celosia argentea* como fonte de inóculo, foram inoculadas as espécies de *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium murale*, *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana occidentalis, Gomphrena globosa*, *Allium tuberosum* (cebolinha japonesa), *Allium porrum* (alho-porro) e *Allium fistulosum* (cebolinha) descritas como hospederias de carlavirus de alho (VAN DIJK, 1993).

Outro teste foi realizado utilizando os isolados positivos preservados na forma de dessecado, inoculadas diretamente nas plantas citadas anteriormente.

As avaliações quanto à presença de sintomas foram realizadas periodicamente após inoculação e a presença viral checada pelo teste de ELISA utilizando-se antissoros para potyvirus e carlavirus.

5.2.4. Caracterização molecular dos isolados

5.2.4.1. Extração de RNA total

Para a extração de RNA total, foi utilizado o método descrito por Bertheau e colaboradores (1998). As folhas foram trituradas (1:5 p/v) em tampão PBS-Tween contendo PVP K25 a 2% (p/v) e Na-DIECA 20 mM, e centrifugadas em tubos de microcentrífuga por 10 minutos a 13.000 rpm. Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, acrescentando-se SDS a 1%. Após incubação a 55 °C por 15 minutos, adicionou-se 100 µl de solução de acetato de potássio a 3 M, seguido de agitação, incubação em gelo por 5 minutos e centrifugação por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 700 µl de NaI 6 M e 5 µl de uma solução contendo silício, previamente agitada para a ressuspensão do silício. A solução foi agitada e mantida em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida a solução foi centrifugada por um minuto a 5.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o "pellet" lavado duas vezes com 500 µl de Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM e igual volume de etanol absoluto. Após centrifugação por 1 minuto a 5.000 rpm, o "pellet" foi secado a vácuo e o RNA ressuspendido em 400 µl de água Milli-Q tratada com DEPC, seguido de incubação por 5 minutos a 55 °C e centrifugação por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante (300 µl) foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20 °C.

5.2.4.2. Obtenção de oligonucleotídeos específicos para amplificação das espécies de carlavirus identificadas em alho

Através de um alinhamento múltiplo das principais espécies de carlavirus descritas no mundo, utilizando o programa MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) foram sintetizados oligonucleotídeos universais para carlavirus e oligonucleotídeos específicos para GarCLV e SLV (Tabela 2). A construção desses primers foi baseada na região codificadora para a capa protéica do vírus (Apêndice 1), amplificando parcialmente esta região.

Para a amplificação da região completa da capa protéica, foram sintetizados outros primers específicos para as espécies GarCLV e SLV. Foram realizados alinhamentos, como descrito anteriormente, com sequências depositadas no GenBank. Os números de acessos AB004805, AB004804, AB004566 e X81138 foram utilizados para sintetizar os oligonucleotideos para GarCLV, e para a síntese de primers para SLV os números de acessos para o alinhamento foram AB004802, AB004803, D11161 e NC003557. As sequências dos primers estão descritas na tabela 2.

O primer PC-R4 (5'-ACCGATTCAACTGGAAGAATTCGCGG-3') antisenso, desenhado por Tsuneyoshi e colaboradores (1998), foi testado para a amplificação completa da capa protéica de GarCLV. As combinações de todos os primers utilizados estão descritos no quadro 1.

Tabela 2 – Sequências dos oligonucleotídeos obtidos para amplificação parcial e completa da região codificadora para capa protéica de espécies de carlavirus em alho.

Oligonucleotídeo	Sequência
SLV 7180 (senso)	5' – AATGATGTTGGNGTBATGG – 3'
SLV 7303 (senso)	5' – GGNTGGGAATCTGGNAGCCC – 3'
GCLV 7114 (senso)	5' – AGAGCTMGRCAGGATGCTGC – 3'
GCLV 7303 (senso)	5' – GGSTTTGARACTGGGAGGCC – 3'
SLV/GCLV 7303 (senso)	5' – GGNTKKGAAWCTGGGAGDCC – 3'
SLV/GCLV 7665 (antisenso)	5' – CATKTMATTCCAAACAACNGGYGC – 3'
SLV 7044 (senso)	5' – CTTTTGGTTCACTTTAGG – 3'
SLV 7052 (senso)	5' – TCACTTTAGGTTHACAGCGC – 3'
SLV 8004 (antisenso)	5' – GCACGCAATAGTCTACGG – 3'
GCLV 305 (senso)	5' – CTGAATTCATTGAGTACGCC – 3'
GCLV 337 (senso)	5' – GTAGCTAGACATTGGTAGCC – 3'
GCLV 1623 (antisenso)	5' – CCTAATCGTCCCACAACG – 3'

Quadro 1 – Combinações de primers utilizados para a amplificação de carlavirus em alho, tamanho esperado do fragmento e região amplificada.

Nº	Combinações	Tamanho fragmento	Região amplificada
1	SLV/GCLV 7303 e SLV/GCLV 7665	370 bp	Parte da porção codificadora para a proteína capsidial do GarCLV e SLV
2	GCLV 7303 e SLV/GCLV 7665	370 bp	Parte da porção codificadora para a proteína capsidial do GarCLV
3	GCLV 7114 e SLV/GCLV 7665	550 bp	Parte da porção codificadora para a proteína capsidial do GarCLV
4	GCLV 337 e GCLV 1623	1290 bp	Região completa da proteína capsidial de GarCLV
5	GCLV 305 e GCLV 1623	1300 bp	Região completa da proteína capsidial de GarCLV
6	GCLV 305 e PC-R4	1300 bp	Região completa da proteína capsidial de GarCLV
7	GCLV 337 e PC-R4	1300 bp	Região completa da proteína capsidial de GarCLV
8	SLV 7303 e SLV/GCLV 7665	370 bp	Parte da porção codificadora para a proteína capsidial do SLV
9	SLV 7180 e SLV/GCLV 7665	490 bp	Parte da porção codificadora para a proteína capsidial do SLV
10	SLV 7052 e SLV 8004	960 bp	Região completa da proteína capsidial de SLV
11	SLV 7044 e SLV 8004	960 bp	Região completa da proteína capsidial de SLV

5.2.4.3. Transcrição reversa e reação de Polimerização em Cadeia (RT-PCR)

Para a amplificação parcial da região da capa protéica de GarCLV, os oligonucleotídeos foram testados em RT-PCR em uma só etapa, utilizando-se o Kit PCR Master Mix (Promega). Para um volume de 25 µl adicionou-se 12,5 µL de PCR Master Mix 2X, 100 µM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade da transcriptase reversa AMV (Avian myeloblastosis virus, marca Promega a 15 unidades/µL), 2,5 µL de RNA e Nuclease Free Water para completar o volume de 25 µL .O ciclo utilizado consistiu em 30 minutos a 42 °C,

seguido de 1 minuto à 95 °C, 40 ciclos de 94 °C/40 segundos, 50 °C/60 segundos e 72 °C/60 segundos, e finalizando com 72 °C por 10 minutos.

Para a reação de amplificação da região completa da capa protéica de GarCLV, primeiramente foi necessário realizar a síntese do cDNA com 5 µl de RNA, 100 µM de primer oligo dT(18) e 13 µl de água, seguido de aquecimento de 70 °C durante 5 minutos e imediatamente resfriado no gelo, em seguida foram adicionados à reação 5 µl de 5x AMV RT buffer (Promega), 1 unidade de transcriptase reversa AMV (Promega) e 200 µM de dNTP, incubando a reação durante 60 minutos à 42 °C. Após a síntese do cDNA, foi realizada a reação de PCR utilizando 12,5 µl de PCR Master Mix (Ampliqon), 2 µl de cDNA, 100 µM de cada oligonucleotídeo (descritos no Quadro 1), testando as combinações 4, 5, 6 e 7, e Nuclease Free Water para completar o volume de 25 µL. A reação consistiu de 1 minutos à 95 °C, 40 ciclos de 94 °C/40 segundos, 55 °C/60 segundos e 72 °C/2 minutos, e extensão final de 72 °C durante 10 minutos.

Para amplificação completa da capa protéica de SLV foi utilizado as mesmas proporções de reagentes descritos para amplificação parcial de GarCLV, utilizando as combinações de primers 8, 9, 10 e 11 (Quadro 1), alterando-se a reação para: 30 minutos a 42 °C, seguido de 1 minutos à 95 °C, 40 ciclos de 94 °C/40 segundos, 55 °C/60 segundos e 72°C/2 minutos, e extensão final de 72°C por 10 minutos.

5.2.4.4. Análise do PCR em gel de agarose

Foram retirados 5 µl da reação de RT-PCR para análise em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE (0,1 M de ácido bórico, 0,02 mM EDTA pH 8,3). Utilizou-se o marcador 1kb DNA Ladder Plus (Invitrogen). O gel foi corado com Brometo de Etídio (0,1µL/mL), e assim, visualizado em transiluminador.

5.2.4.5. Purificação do Produto de PCR

Quatorze isolados amplificados com os primers SLV/GCLV 7303 e SLV/GCLV 7665 foram selecionados para sequenciamento, onde os fragmentos foram

purificados a partir do gel de agarose, utilizando o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), e posteriormente quantificados utilizando o marcador de peso molecular Low DNA mass Ladder (Invitrogen). As amostras que apresentaram concentrações acima de 20 ng/µL foram sequenciadas diretamente a partir do produto de PCR, e as que apresentaram concentrações inferiores a 20 ng/µL tiveram que ser clonadas para que fosse possível realizar o sequenciamento.

5.2.4.6. Clonagem

O fragmento amplificado e purificado foi clonado em vetor pGEM-T easy (Promega). A reação de ligação contendo 0,5 µL do vetor pGEM-T easy, 0,5 µL de enzima T4 DNA ligase, 5,0 µL de tampão 2x e 4,0 µL do produto de PCR purificado foi incubada por 16 horas a 4 °C. Para transformação foi utilizado 2 µL da reação de ligação, 40 µL de célula de *Escherichia coli* cepa XL1 e 40 µL de glicerol a 10%, em seguida a amostra foi eletroporada a um pulso de 1,25 kV, com capacitância de 50µF e resistência de 100 ohms, utilizando cubeta de 0,1mm. Imediatamente após eletroporação, adicionou-se 500 µL de meio SOC (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM glicose) e levado para incubação durante 1 hora a 37 °C, sob agitação.

Em placas de Petri com o meio LB-Agar (USB) + ampicilina (100 µg/mL), foram adicionados 500 µL de células competentes transformadas, contendo em cada placa 50 µL de X-gal (20mg/mL), 50µL de IPTG (24mg/mL), e 100 µL de meio LB-Broth (USB). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 16 horas.

5.2.4.6.1. Seleção dos clones recombinantes

As colônias bacterianas transformadas (brancas) foram repicadas em tubos contendo 5 mL do meio LB-Broth (USB) acrescido de ampicilina (100 µg/mL), onde foram mantidas sob agitação de 180 rpm, durante 16 horas, a 37 °C.

Após o crescimento das bactérias, foram realizadas as extrações do DNA plasmidial utilizando o Kit Wizard Plus SV Minipreps-DNA Purification System (Promega) e posteriormente as amostras foram clivadas com enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen), seguindo protocolo do fabricante, e incubadas a 37 °C durante 1 hora. Para a observação da presença do fragmento de interesse, foi realizado eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

As amostras contendo o fragmento de interesse foram clivadas com enzima *Pst*I para linearização e posterior quantificação em gel de agarose 0,8%, utilizando marcador High DNA Mass Ladder (Invitrogen).

5.2.4.7. Sequenciamento

Os produtos foram enviados para a plataforma de sequenciamento do Centro de Estudos de Genoma Humano da USP e para Macrogen (Korea).

As amostras sequenciadas foram analisadas pelo programa 'NCBI-BLAST' (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e Clustal W (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html), e a construção da árvore filogenética foi realizado no programa MEGA 4.0.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Análise das amostras coletadas

O quadro 2 demonstra o número total de amostras analisadas, juntamente com as amostras positivas para os testes realizados.

Através da microscopia eletrônica, das 188 amostras analisadas, em 155 foi possível observar algum tipo de partícula alongada. Destas amostras foram realizadas as extrações de RNA total para confirmação da presença viral por RT-PCR, sendo que somente em 11 amostras foram confirmadas a infecção por carlavirus, utilizando-se os primers SLV/GCLV 7303 e SLV/GCLV 7665. Deste modo, constatou-se que houve baixa sensibilidade no teste de diagnose através da microscopia eletrônica, devido a baixa concentração de partículas virais, e também pela semelhança entre as partículas de carlavirus e potyvirus, dificultando o processo de diagnose. Optou-se, portanto pelo teste de ELISA, através da utilização de antissoros para carlavirus e potyvirus, para facilitar o processo de diagnose e também a detecção de infecção mista nos materiais coletados.

Através da análise de 731 amostras provenientes de campo, utilizando-se o teste de ELISA, 560 mostraram-se positivas somente para potyvirus, em 53 amostras houve a confirmação de infecção mista entre GarCLV e potyvirus, sete amostras foram positivas para SLV e potyvirus, duas amostras positivas somente para GarCLV, uma para SLV (Quadro 3), e 108 amostras apresentaram-se negativas para os testes realizados. Não houve correlação da ocorrência de carlavirus com as regiões produtoras do País, provavelmente

devido ao intercambio de alho-semente entre as regiões Sul, Sudeste, Cerrado de Goiás e Minas Gerais.

Dovas e colaboradores (2001) realizaram levantamento das espécies de vírus em alho na Grécia, e detectaram isolados de GarCLV em materiais de propagação vegetativa importados da Itália. Nas demais regiões analisadas, encontraram baixa incidência dessa espécie sendo sua ocorrência restrita às regiões sul e central da Grécia. Estes mesmos autores observaram menor incidência de carlavirus em alho quando comparada aos potyvirus.

Alguns trabalhos indicam que as espécies de carlavirus são restritas somente a algumas regiões do mundo, como demonstrado por Barg e colaboradores (1994), onde a espécie de GarCLV foi raramente encontrado em amostras provenientes de Taiwan e Tailândia, enquanto que nas regiões da Índia, Indonésia, Korea e Nepal há alta incidência de GarCLV em amostras de alho. O mesmo ocorre com espécies de SLV que são encontradas em baixa incidência em países como Grécia, Itália (DOVAS *et al.,* 2001) e Espanha, enquanto que na China e Republica Tcheca foram detectados em 100% das amostras analisadas (KLUKACKOVÁ *et al.,* 2007).

Espécies de potyvirus que infectam alho são encontradas com maior frequência que os carlavirus devido a eficiência de transmissão dos potyvirus pelos afídeos (VAN DIJK, 1993; DOVAS *et al.,* 2001), dados confirmados também nesse trabalho, como demonstra o quadro 4. A transmissão de SLV é menos eficiente quando comparado com as demais espécies de vírus que infectam alho (DIEKMANN, 1997 apud KLUKACKOVÁ *et al.,* 2007).

Quadro 2 – Levantamento de potyvirus e carlavirus em algumas regiões produtoras do Brasil, coletados nos períodos de maio de 2007 a julho de 2009.

Local de coleta	Cultivares	Microscopia eletrônica	ELISA			RT-PCR	
			Potyvirus	GarCLV	SLV	GarCLV	SLV
Guarapuava / PR	Caçador	6 / 1	136 / 118	136 / 1	136 / 0	2 / 2	0 / 0
Bandeirantes / PR	Caçador	4 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
Piraquara / PR	Chonan, Ito	0 / 0	131 / 50	131 / 2	131 / 7	2 / 2	7 / 1
Santa Juliana / MG	Caçador, Jonas, Quitéria	99 / 3	356 / 345	356 / 14	356 / 0	25 / 19	0 / 0
São Gotardo / MG	Caçador	5 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
São Manuel / SP	Cajuru, Caçador, Tropical, Chonan, São José, São Valentim	48 / 1	80 / 80	80 / 38	80 / 0	38 / 36	3 / 1
Ipameri / GO	Quitéria, Jonas, Ito	12 / 6	20 / 19	20 / 0	20 / 0	6 / 6	2 / 0
Campo Alegre / GO	Caçador	14 / 0	8 / 8	8 / 0	8 / 0	0 / 0	0 / 0
Total		**188 / 11**	**731 / 620**	**731 / 55**	**731 / 7**	**73 / 65**	**12 / 2**

Quadro 3 – Data, cultivar e local de coleta dos isolados positivos para carlavirus, testados por microscopia, ELISA e RT-PCR.

N°	Data coleta	Cultivar	Local de coleta	Identificação	ELISA			PCR	
					Potyvirus	GarCLV	SLV	GarCLV	SLV
1	07/05/07	Quitéria	Ipameri / GO	5.2	*	*	*	+	N
2				5.3	*	*	*	+	-
3				5.4	*	*	*	+	N
4				5.5	*	*	*	+	N
5				5.6	*	*	*	+	N
6	05/07/07	Ito	Santa Juliana / MG	6.1	*	*	*	+	-
7	21/05/07	Jonas	Santa Juliana / MG	13.14	*	*	*	+	N
8	11/06/07	Caçador	Santa Juliana / MG	18.1	*	*	*	+	N
9	11/06/07	Ito	Ipameri / GO	26.2	*	*	*	+	-
10	23/08/07	Ito	São Manuel /SP	37.1	*	*	*	+	N
11	13/09/07	Caçador	Guarapuava / PR	45.6	*	*	*	+	N
12	26/05/08	Caçador	Santa Juliana / MG	54.1	/	/	/	+	N
13				54.4	/	/	/	+	N
14				54.5	/	/	/	+	N
15				54.6	/	/	/	+	N
16				54.7	/	/	/	+	N
17				54.8	/	/	/	+	N
18				54.9	/	/	/	+	N
19	27/05/08	Tropical	São Manuel / SP	55.3	+	+	-	+	N
20	02/07/08	Tropical	São Manuel / SP	65.1	+	+	-	+	N
21				65.2	+	+	-	+	N
22				65.3	+	+	-	+	N
23				65.4	+	+	-	+	N
24	02/07/08	São Manuel	São Manuel	66.1	+	+	-	+	+
25				66.2	+	+	-	+	N

Continua

N°	Data coleta	Cultivar	Local de coleta	Identificação	ELISA			PCR	
					Potyvirus	GarCLV	SLV	GarCLV	SLV
26	02/07/08	São Manuel	São Manuel / SP	66.3	+	+	-	+	N
27				66.4	+	+	-	+	N
28	02/07/08	24 Peneira 2	São Manuel / SP	68.1	+	+	-	+	N
29				68.3	+	+	-	+	-
30	02/07/08	São José	São Manuel / SP	69.1	+	+	-	+	N
31				69.2	+	+	-	+	N
32	02/07/08	Tropical	São Manuel / SP	70.1	+	+	-	+	N
33	02/07/08	Cajuru	São Manuel / SP	71.1	+	+	-	+	-
34	02/07/08	Ito	São Manuel / SP	73.1	+	+	-	+	N
35				73.2	+	+	-	+	N
36				73.3	+	+	-	+	N
37				73.4	+	+	-	+	N
38	02/07/08	Tropical	São Manuel / SP	75.1	+	+	-	+	N
39				75.2	+	+	-	+	N
40				75.3	+	+	-	+	N
41	02/07/08	Peneira 2	São Manuel / SP	76.1	+	+	-	+	N
42				76.2	+	+	-	+	N
43				76.3	+	+	-	+	N
44	07/07/08	Caçador	Santa Juliana / MG	77.3	+	+	-	+	N
45				77.5	+	+	-	+	N
46				77.6	+	+	-	+	N
47	07/07/08	Caçador	Santa Juliana / MG	78.3	+	+	-	+	N
48	07/07/08	Quitéria	Santa Juliana / MG	81.1	+	+	-	+	N
49				81.2	+	+	-	+	N
50				81.3	+	+	-	+	N

Continua

N°	Data coleta	Cultivar	Local de coleta	Identificação	ELISA			PCR	
					Potyvirus	GarCLV	SLV	GarCLV	SLV
51	07/07/08	Quitéria	Santa Juliana / MG	81.4	+	+	-	+	N
52				81.5	+	+	-	+	N
53	11/09/08	Caçador	Guarapuava / PR	88.5	+	+	-	+	N
54	01/10/08	Caçador	Piraquara / PR	90.8	-	-	+	-	-
55				90.70	-	+	-	+	N
56				90.71	-	+	-	+	N
57	10/10/08	Caçador	Piraquara / PR	95.1	+	-	+	-	-
58				95.2	+	-	+	-	+
59				95.3	+	-	+	-	-
60				95.4	+	-	+	-	-
61				95.5	+	-	+	-	-
62				95.6	+	-	+	-	-
63	29/05/09	Caçador	Santa Juliana / MG	96.82	+	-	-	-	-
64				96.22	+	+	-	-	N
65				96.56	+	+	-	-	N
66				96.109	+	+	-	-	N
67				96.145	+	+	-	-	N
68				96.159	+	+	-	-	N
69	08/07/09	Cajuru	São Manuel / SP	101.1	+	+	-	+	N
70				101.2	+	+	-	+	N
71				101.3	+	+	-	-	N
72				101.4	+	+	-	+	N
73	08/07/09	Tropical São Manuel	São Manuel / SP	103.1	+	+	-	+	N
74				103.3	+	+	-	+	N
75				103.4	+	+	-	+	N

Continua

N°	Data coleta	Cultivar	Local de coleta	Identificação	ELISA			PCR	
					Potyvirus	GarCLV	SLV	GarCLV	SLV
76	08/07/09	Tropical São Manuel	São Manuel / SP	103.5	+	+	-	-	N
77				103.6	+	+	-	+	N
78				103.7	+	+	-	+	N
79	08/07/09	Tropical	São Manuel / SP	104.1	+	+	-	+	N
80				104.3	+	+	-	+	N
81	08/07/09	Chonan	São Manuel / SP	106.2	+	+	-	-	N

Amostras marcadas com asterisco (*) correspondem a analises por microscopia eletrônica; (/) Amostras não testadas por ELISA e nem por microscopia eletrônica; (+) amostras positivas; (-) amostras negativas; (N) amostras não testadas

Quadro 4 – Porcentagem de ocorrência de potyvirus e carlavirus em algumas regiões produtoras do Brasil, analisadas nos períodos de abril de 2008 a julho de 2009.

Local de coleta	**Potyvirus (%)**	Carlavirus		Infecção mista entre potyvirus e carlavirus (%)
		GarCLV (%)	**SLV (%)**	
Guarapuava / PR	86,76%	0,76%	0%	0,73%
Bandeirantes / PR	0%	0%	0%	0%
Piraquara / PR	38,16%	1,52%	5,34%	4,58%
Santa Juliana / MG	96,91%	3,93%	0%	0%
São Gotardo / MG	0%	0%	0%	0%
São Manuel / SP	100%	47,5%	1,25	48,75%
Ipameri / GO	95%	0%	0%	0%
Campo Alegre / GO	100%	0%	0%	0%
Total (amostras coletadas/amostras positivas)	**84,81%**	**7,52%**	**1,09%**	**7,11%**

6.2. Gama de hospedeiras

A partir de folhas de alho sabidamente infectadas com potyvirus e carlavirus foi possível isolar carlavirus inoculando-se plantas de *Celosia argentea, o*bservando-se sintomas de anéis cloróticos (Figura 3A) e mosaico (Figura 3B). Entretanto, utilizando-se o extrato vegetal da espécie *Celosia argentea*, não foi possível a transmissão de isolados de carlavirus para outras espécies indicadas como suscetíveis, nem mesmo de celosia para celosia, indicando que esta não é uma hospedeira recomendada para a manutenção de carlavirus. Esse procedimento foi realizado devido ao fato dos materiais provenientes de campo apresentarem infecções mistas, e por essa planta não ser suscetível a potyvirus.

Desta forma, o experimento foi repetido utilizando-se folhas de alho positivas para GarCLV e inoculando-se diretamente em plantas de *Chenopodium amaranticolor*, *Celosia argentea*, *Chenopodium murale*, *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana occidentalis, Gomphrena globosa*, *Allium tuberosum* (cebolinha japonesa), *Allium porrum* (alho-porro) e *Allium fistulosum* (cebolinha). Através da análise de sintomas após inoculação, foi possível visualizar novamente em plantas de *Celosia argentea* a presença de anéis cloróticos e também sintomas de mosaico. Em *Nicotiana occidentalis* foi possível observar pontos cloróticos (Figura 3C), e em *Chenopodium quinoa* a presença de lesões locais (Figura 3D). A presença do vírus foi confirmada pelo teste de ELISA e por RT-PCR. Nas demais plantas inoculadas não foi observado nenhum tipo de sintoma, bem como presença de vírus pelos testes citados acima. Apesar dos isolados provenientes do campo apresentarem infecção mista, foi possível isolar somente carlavirus em todas as hospedeiras citadas anteriormente.

Nem todas as plantas descritas na literatura como suscetíveis para carlavirus foram infectadas por isolados brasileiros, o que concorda com dados apresentados por Van Dijk (1993), onde alguns isolados apresentaram lesões locais em *Celosia argentea, Chenopodium amaranticolor, C. murale, C. quinoa* e *Nicotiana occidentalis*. As espécies de *Celosia argentea* e *Nicotiana occidentalis* foram selecionadas pelo autor para utilização em rotina por apresentarem resultados confiáveis, enquanto que as demais plantas apresentaram resultados negativos ou insatisfatórios.

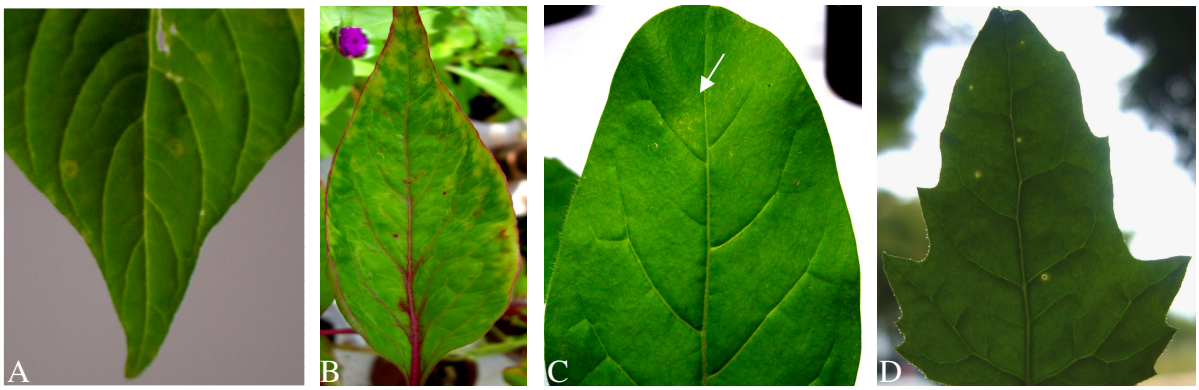

Figura 3 – Plantas inoculadas com isolados provenientes de campo infectados com GarCLV. (A) *Celosia argentea* apresentando anéis cloróticos; (B) *Celosia argentea* com sintomas de mosaico; (C) *Nicotiana occidentalis* com pontos cloróticos; (D) *Chenopodium quinoa* com lesões locais.

De acordo com dados da literatura, plantas de *C. quinoa* são consideradas suscetíveis para diversas espécies de potyvirus, inclusive os de alho (Brunt *et al.*, 1996), porém diante dos resultados obtidos neste trabalho, mesmo havendo infecção mista nos isolados utilizados para inoculação nas plantas hospedeiras, somente espécies de GarCLV foram transmitidas para plantas de *C. quinoa*. Isolados de GarCLV foram transmitidos para plantas de *C. quinoa* causando lesões locais cloróticas (BARG *et al.,* 1994).

6.3. Análises moleculares

6.3.1. Teste de eficiência dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos universais e específicos para GarCLV foram testados com amostras provenientes de campo e mostraram-se eficientes para amplificação parcial da região da capa protéica do vírus (fragmento de aproximadamente 370bp). Amostras positivas para GarCLV foram testadas com primers específicos de SLV, porém não foi verificada amplificação inespecífica com os mesmos (Figura 4).

As amostras positivas para GarCLV por ELISA foram testadas por RT-PCR, e algumas amostras não amplificaram com os primers sintetizados. Possivelmente há uma variabilidade entre as estirpes de GarCLV encontradas no campo.

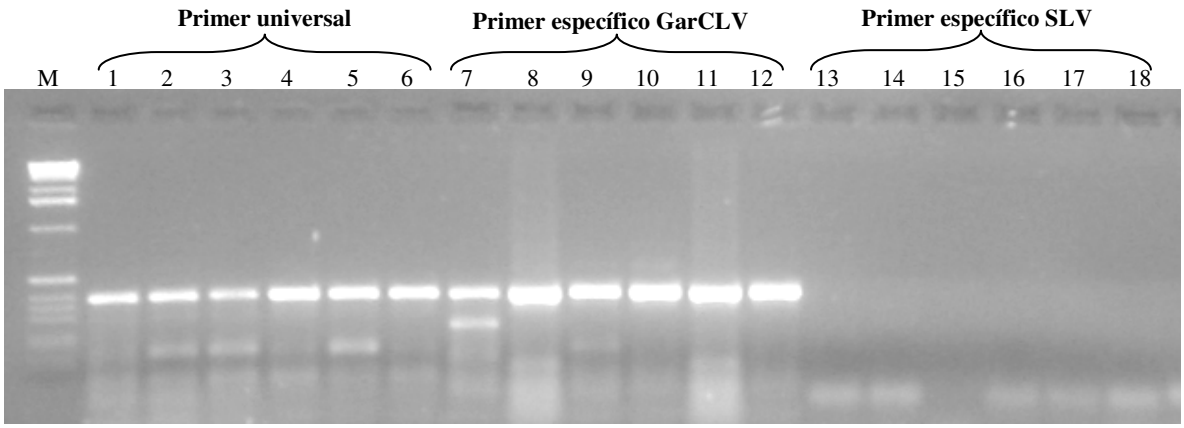

Figura 4 – Gel de agarose 0,8% com reações de RT-PCR com amostras positivas de GarCLV utilizando-se primers universais e específicos para GarCLV e SLV. (M) Marcador 1 Kb Ladder (invitrogen); (1-6) Teste com primers SLV/GCLV 7303 e SLV/GCLV 7665; (7-12) Teste com primers GCLV 7114 e SLV/GCLV 7665; (13-18) Teste com primers SLV 7303 e SLV/GCLV 7665.

Inicialmente não foi possível testar a eficiência dos primers para SLV, pois não se dispunha de um controle positivo para o vírus, já que o mesmo é considerado uma praga exótica no Brasil. No entanto, foi possível detectar pela primeira vez a ocorrência de SLV na amostra 66.1 proveniente de São Manuel/SP, através da utilização do primer universal (SLV/GCLV 7303 e SLV/GCLV 7665). A principio, no teste de ELISA essa amostra apresentou-se negativa para SLV e positiva para GarCLV. Porém, a partir da amplificação com o primer universal e posterior clonagem para sequenciamento, verificou-se identidade de 90% com isolados de SLV disponíveis no GenBank.

Algumas amostras provenientes de Piraquara/PR reagiram contra antissoro de SLV, como mostra o quadro 3. Estas amostras e também a 66.1 foram utilizadas no teste de eficiência dos primers sintetizados para região parcial da proteína capsidial de SLV, porém estes primers mostraram-se ineficientes pois geraram diversas bandas inespecíficas. Diversos fragmentos foram sequenciados evidenciando amplificação de partes do genoma de alho.

Somente após a síntese de primers específicos para região completa da capa protéica de SLV foi possível realizar a amplificação e sequenciamento dos isolados 66.1 e 95.2 (Figura 5), utilizando-se as combinações de primers SLV 7044 (senso) e SLV 8004 (antisenso). As demais amostras positivas para SLV pelo teste de ELISA, não tiveram

fragmentos amplificados pelos primers de SLV, indicando reações inespecíficas com o antissoro.

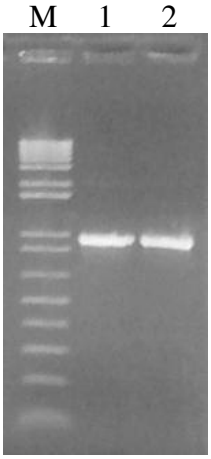

Figura 5 – Gel de agarose 0,8% com reações de RT-PCR de SLV utilizando primers para amplificação da região completa da proteína capsidial. (M) Marcador 1 Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen); (1) Amostra 66.1; (2) Amostra 95.2.

Através da análise das amostras, foram detectados pela primeira vez no Brasil a espécie de SLV, encontrados nas regiões de Piraquara/PR e São Manuel/SP. As amostras de alho provenientes de Piraquara passaram por cultura de tecido, porém a origem inicial dos bulbos é desconhecida. Amostra de alho 'Tropical' coletada no município de São Manuel que também se mostrou infectada pelo SLV, tem sua procedência inicial de bulbos desconhecida, e este material já vem sendo cultivado na região de São Manuel há aproximadamente 15 anos, o que indica que o vírus foi introduzido no Brasil há muitos anos. A não detecção do SLV até o momento se deve possivelmente à baixa sensibilidade dos testes até então utilizados e a baixa incidência O próprio teste de ELISA com antissoro monoclonal anti-SLV da Agdia mostrou-se ineficiente na detecção do SLV. A detecção dessa espécie nesse trabalho foi possível, pois foram desenhados primers específicos que funcionaram na diagnose do mesmo.

Para caracterização de carlavirus, Fajardo (1998) utilizou o oligonucleotideo Carla-Uni (5´-GGA GTA ACC GAG GTG ATA CC-3´) desenhado por Badge e colaboradores (1996), mostrando-se eficiente para detecção de GarCLV. Entretanto trabalhos desenvolvidos anteriormente no Laboratório de Virologia da FCA, testaram a eficiência desse primer, apresentando resultados insatisfatórios, por esta razão novos

oligonucleotideos, foram sintetizados para realização desse trabalho. Os dados obtidos permitem afirmar que os primers para amplificação parcial da proteína capsidial de carlavirus em alho podem ser utilizados em rotina para detecção, porém só é possível diferenciar as espécies de SLV e GarCLV quando utilizados os primers específicos.

As combinações dos primers para a amplificação da região completa da proteína capsidial de GarCLV foram testados, obtendo-se fragmento do tamanho esperado com os pares de primers GCLV 305 (senso) e PC-R4 (antisenso). As amostras foram enviadas para Empresa Macrogen (Korea) a fim de realizar o sequenciamento dos fragmentos obtidos, porém os resultados mostraram-se insatisfatórios, pois amplificaram regiões inespecíficas do genoma.

6.3.2. Análise da variabilidade genética dos isolados

Após realizar o teste dos primers para a região parcial da proteína capsidial de GarCLV, quatorze amostras foram selecionadas para sequenciamento, e a partir do alinhamento de nucleotídeos (Figura 6) e de aminoácidos (Apêndice 2) obteve-se um quadro de identidade entre os diferentes isolados de GarCLV (Quadro 5), e também a árvore filogenética (Figura 8). Foi possível verificar que a identidade variou entre 97% a 100% para aminoácidos e 87% a 97% de nucleotídeos entre sequências depositadas no GenBank.

Através do alinhamento de nucleotídeos de SLV (Figura 7) e aminoácidos (Apêndice 3) dos isolado 95.2 (número de acesso GU120175) e 66.1 (número de acesso GU120176) foi possível verificar que a identidade variou entre 90% a 99% para nucleotídeos e 96% a 99% para aminoácidos quando comparadas com sequências de SLV depositadas no GenBank (Quadro 6).

A sequência de GarCLV obtida de um isolado proveniente do Brasil, apresentou identidade de 83,3% com sequências depositadas no GenBank (FAJARDO *et al.,* 2001), e quando comparado esse isolado com as sequências obtidas nesse trabalho, a identidade de nucleotídeos variou entre 87% a 97%, mostrando que há variabilidade tanto entre os isolados brasileiros como de outros países. Esses resultados são confirmados através da árvore filogenética obtida a partir de sequências de nucleotídeos, revelando que os isolados

de GarCLV coletados não apresentam correlação com as regiões de coleta, possivelmente pela entrada de bulbos de alho de diferentes regiões geográficas do mundo.

Figura 6 – Alinhamento da sequência parcial da região da capa protéica de isolados de GarCLV.

```
Isolado_5.3                CGTGGCGACACATCTAATGTATTCACCAGGCCTAGCATGGACGCCTTAAT 50
Isolado_5.6                CGTGGCGACACTTCTAATGTATTCACCAGGCCTAGCATGGATGCCTTAAT 50
Isolado_18.1               CGTGGCGACACATCTAATGTATTCACCAGGCCTAGCATGGATGCCTTAAT 50
Isolado_90.71              CGTGGCGACACATCTAATGTATTCACCAGGCCTAGCATGGATGCCTTAAT 50
Isolado_37.1               CGTGGCGACACATCTAATGTTTTCACCAGGCCTAGCATGGATGCCTTAAT 50
Isolado_81.1               CGTGGCGACACATCTAATGTTTTCACCAGGCCTAGCATGGATGCCTTAAT 50
GarCLV_Taiwan_AB004566     CGCGGCGACACTTCTAATGTATTCACCAGGCCTAGCATGGATGCTTTAAT 50
Isolado_6.1                CGCGGCGACACTGCGAATGTATTCACTAGGCCTAGCATGGATGCCTTGAT 50
Isolado_26.2               CGCGGCGACACTGCGAATGTATTCACTAGGCCTAGCATGGATGCCTTGAT 50
Isolado_73.1               CGCGGCGACACTGCAAATGTATTCACTAGGCCTAGCATGGATGCCTTGAT 50
Isoldo_68.3                CGCGGCGACACTGCTAATGTATTCACTAGGCCTAGCATGGATGCTTTGAT 50
GarCLV_Korea_DQ520092      CGCGGCGACACAGCTAACGTATTCACTAGGCCTAGCATGGATGCTTTGAT 50
GarCLV_Brasil_AF228416     CGTGGCGACACTGCTAATGTATTTACTAGGCCCAGCATGGATGCTTTAAT 50
Isolad_55.3                CGCGGCGACACTTCTAATGTTTTCACTAGGCCCAGCATGGATGCCTTAAT 50
Isolado_69.1               CGCGGCGACACTTCTAATGTTTTCACTAGGCCCAGCATGGATGCCTTAAT 50
Isolado_75.1               CGCGGCGACACTTCTAATGTTTTCACTAGGCCCAGCATGGATGCCTTAAT 50
Isolado_76.1               CGCGGCGACACTGCTAATGTTTTCACTAGGCCCAGCATGGATGCTTTAAT 50
GarCLV_Holanda_AB004804    CGCGGCGACACAGCTAATGTATTCACTAGGCCTAGCATGGATGCTTTAAT 50
                           ** ********  * ** ** ** ** ***** ******** ** ** **

Isolado_5.3                AGCTTTAGATTTCAAGGCTGAATCATTGGCTGTTGCAACCGCCGAAGACC 100
Isolado_5.6                AGCTTTGGATTTCAAGGCTGAATCATTGGCTGTTGCAACCGCCGAAGACC 100
Isolado_18.1               AGCTTTGGATTTCAAGGCTGAATCATTAGCTGTTGCAACCGCCGAAGACC 100
Isolado_90.71              TGCGTTGGATTTCAAGGCTGAATCATTGGCTGTTGCAACCGCCGAAGACC 100
Isolado_37.1               AGCTTTGGATTTCAAGGCTGAATCATTGGCTGTTGCAACCGCCGAAGACC 100
Isolado_81.1               AGCTTTGGATTTCAAGGCTGAATCATTGGCTGTTGCAACCGCCGAAGACC 100
GarCLV_Taiwan_AB004566     AGCTTTAGATTTCAAGGCTGAATCATTGGCAGTTGCGACCGCCGAGGACC 100
Isolado_6.1                AGCACTGGACTTCAAAGCCGAATCCTTGGCAGTTGCTACTGCTGAAGACC 100
Isolado_26.2               AGCACTGGACTTCAAAGCCGAATCCTTGGCAGTTGCTACTGCTGAAGACC 100
Isolado_73.1               AGCACTGGACTTCAAAGCCGAATCCTTGGCAGTTGCTACTGCTGAAGACC 100
Isoldo_68.3                AGCATTGGACTTCAAAGCTGAATCCTTGGCAGTTGCGACTGCTGAAGACC 100
GarCLV_Korea_DQ520092      AGCACTGGACTTCAAAGCTGAATCCTTGGCAGTTGCGACTGCAGAAGACC 100
GarCLV_Brasil_AF228416     AGCATTGGACTTCAAAGCTGAATCCTTGGCTGTCGCGACTGCTGAAGACC 100
Isolad_55.3                AGCATTGGACTTCAAAGCTGAATCCTTAGCAGTTGCGACTGCTGAAGACC 100
Isolado_69.1               AGCATTGGACTTCAAAGCTGAATCCTTAGCAGTTGCGACTGCTGAAGACC 100
Isolado_75.1               AGCATTGGACTTCAAAGCTGAATCCTTAGCAGTTGCGACTGCTGAAGACC 100
Isolado_76.1               AGCTTTGGATTTTAAGGCTGAATCATTGGCAGTAGCGACCGCTGAAGACC 100
GarCLV_Holanda_AB004804    AGCATTGGATTTCAAGGCTGAATCATTGGCAGTTGCGACTGCTGAAGACC 100
                            **  * ** ** ** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ****

Isolado_5.3                TCGCTGCTATCACTGCAAAATTTGAACAGCTTGGGGTGCCAACGGAGAGA 150
Isolado_5.6                TGGCTGCTATCACTGCAAAATTTGAACAGCTTGGGGTGCCAACGGAAAGA 150
Isolado_18.1               TTGCTGCTATCACTGCAAAATTTGAACAGCTTGGGGTGCCAACGGAGAGA 150
Isolado_90.71              TTGCTGCCATCACTGCTAAATTTGAACAGCTTGGGGTGCCAACGGAGAGA 150
Isolado_37.1               TTGCTGCTATCACTGCAAAATTTGAACAGCTTGGGGTGCCAACGGAGAGA 150
Isolado_81.1               TTGCTGCTATCACTGCAAAATTTGAACAGCTTGGGGTGCCAACGGAGAGA 150
GarCLV_Taiwan_AB004566     TTGCTGCTATCACTGCTAAATTCGAACAGCTAGGGGTGCCAACAGAGAGA 150
Isolado_6.1                TAGCTGCTATTACTGCTAAATTTGAACAGCTTGGGGTGCCGACTGAGAGA 150
Isolado_26.2               TAGCTGCCATTACTGCTAAATTTGAACAGCTTGGGGTGCCGACTGAGAGA 150
```

Continua

```
Isolado_73.1              TAGCTGCTATTACTGCTAAATTTGAACAGCTTGGGGTGCCGACTGAGAGA 150
Isoldo_68.3               TAGCTGCTATCACTGCTAAATTTGAACAGCTTGGGGTGCCAACTGAGAGA 150
GarCLV_Korea_DQ520092     TAGCTGCTATCACTGCTAAATTTGAACAGCTTGGGGTGCCAACTGAGAGA 150
GarCLV_Brasil_AF228416    TAGCTGCTATCACTGCTAAATTTGAACAGCTTGGGGTGCCAACTGAGAGA 150
Isolad_55.3               TAGCTGCTATCACTGCTAAGTTTGAACAGCTTGGGGTGCCAACTGAAAGA 150
Isolado_69.1              TAGCTGCTATCACTGCTAAGTTTGAACAGCTTGGGGTGCCAACTGAAAGA 150
Isolado_75.1              TAGCTGCTATCACTGCTAAGTTTGAACAGCTTGGGGTGCCAACTGAAAGA 150
Isolado_76.1              TAGCTGCCATCACTGCTAAGCTTGAACAACTAGGGGTACCAACTGAAAGA 150
GarCLV_Holanda_AB004804   TTGCTGCCATCACTGCTAAATTTGAGCAGCTCGGGGTGCCAACTGAGAGA 150
                          * ***** ** ***** **  * ** ** ** ***** ** ** ** ***

Isolado_5.3               CTAGCCCCCCTTTGTTGGTCTATTGCAAGATATTGCGCGGATACTAGCTC 200
Isolado_5.6               CTAGCCCCCCTTTGTTGGTCTATTGCAAGATATTGCGCGGATACTAGCTC 200
Isolado_18.1              CTAGCCCCCCTTTGCTGGTCTATTGCAAGATATTGCGCGGATACTAGCTC 200
Isolado_90.71             CTAGCCCCCCTTTGTTGGTCTATTGCAAGATATTGTGCGGATACTAGCTC 200
Isolado_37.1              CTAGCCCCCCTTTGTTGGTCTATTGCAAGATATTGCGCGGATACTAGCTC 200
Isolado_81.1              CTAGCCCCCCTGTGCTGGTCGATTGCAAGATATTGCGCGGATACTAGCTC 200
GarCLV_Taiwan_AB004566    TTGGCTCCTCTTTGTTGGTCGATTGCAAGGTATTGCGCCGACACTAGTTC 200
Isolado_6.1               TTAGCTCCACTTTGTTGGTCGGTTGCAAGGTATTGCGCAGACACAAGTTC 200
Isolado_26.2              TTAGCTCCACTTTGTTGGTCGGTTGCAAGGTATTGCGCAGACACAAGTTC 200
Isolado_73.1              TTAGCTCCACTTTGTTGGTCGGTTGCAAGGTATTGCGCAGACACAAGTTC 200
Isoldo_68.3               TTAGCTCCACTTTGTTGGTCGATTGCAAGGTATTGTGCAGATACAAGTTC 200
GarCLV_Korea_DQ520092     TTAGCACCACTTTGTTGGTCGATTGCAAGGTATTGTGCAGATACGAGTTC 200
GarCLV_Brasil_AF228416    TTAGCTCCACTTTGTTGGTCGATTGCAAGGTACTGTGCAGATACAAGTTC 200
Isolad_55.3               CTAGCCCCACTTTGTTGGTCGATTGCAAGGTATTGTGCTGATACTAGTTC 200
Isolado_69.1              CTAGCCCCACTTTGTTGGTCGATTGCAAGGTATTGTGCTGATACTAGTTC 200
Isolado_75.1              CTAGCCCCACTTTGTTGGTCGATTGCAAGGTATTGTGCTGATACTAGTTC 200
Isolado_76.1              TTAGCCCCTCTTTGTTGGTCGGTTGCAAGGTATTGCGCAGACACGAGTTC 200
GarCLV_Holanda_AB004804   TTAGCTCCCCTTTGTTGGTCGATTGCAAGGTATTGCGCAGATACAAGTTC 200
                           * ** ** ** ** *****  ******* ** ** ** ** ** ** **

Isolado_5.3               TTCGTATGTGGCTGACCCGAAAGGGACTTTTGAATACCCAGGGGGTGCTA 250
Isolado_5.6               TTCGTATGTGGCTGATCCGAAAGGGACTTTTGAATACCTAGGGGGTGCTA 250
Isolado_18.1              TTCGTATGTGGCTGATCCGAAAGGGACTTTTGAATACCCAGGGGGTGCTA 250
Isolado_90.71             TTCGTATGTGGCTGATCCGAAAGGGACTTTTGAATACCCAGGGGGTGCTA 250
Isolado_37.1              TTCGTATGTGGCTGATCCTAAAGGGACTTTTGAATACCCAGGGGGTGCTA 250
Isolado_81.1              TTCTTATGTTGCTGATCCTAAAGGGACTTTTGAATACCCAGGGGGTGCTA 250
GarCLV_Taiwan_AB004566    TTCATATGTGGCTGACCCAAAAGGAACTTTTGAATACCCTGGGGGTGCTA 250
Isolado_6.1               TTCATATGTAGCTGATCCGAAAGGAACTTTTGAATACCCAGGGGGCGCTA 250
Isolado_26.2              TTCATATGTAGCTGATCCGAAAGGAACTTTTGAATACCCAGGGGGCGCTA 250
Isolado_73.1              TTCATATGTAGCTGATCCGAAAGGAACTTTTGAATACCCAGGGGGCGCTA 250
Isoldo_68.3               TTCATATGTAGCTGATCCGAAAGGAACTTTTGAATACCCAGGGGGTGCTA 250
GarCLV_Korea_DQ520092     TTCATATGTAGCTGATCCGAAAGGAACTTTTGAATACCCAGGGGGTGCTA 250
GarCLV_Brasil_AF228416    TTCATATGTGGCTGATCCGAAAGGAACTTTTGAATACCCAGGGGGTGCTA 250
Isolad_55.3               TTCATATGTAGCTGATCCAAAAGGAACTTTCGAATACCCAGGGGGTGCTA 250
Isolado_69.1              TTCATATGTAGCTGATCCAAAAGGAACTTTCGAATACCCAGGGGGTGCTA 250
Isolado_75.1              TTCATATGTAGCTGATCCAAAAGGAACTTTCGAATACCCAGGGGGTGCTA 250
Isolado_76.1              TTCATATGTGGCTGATCCGAAAGGAACTTTTGAATACCCGGGGGGTGCTA 250
GarCLV_Holanda_AB004804   TTCATATGTGGCTGATCCTAAAGGAACTTTTGAATACCCAGGGGGTGCTA 250
                          *** ***** ***** ** ***** ***** *******  ***** ****

Isolado_5.3               TAACAAGGGATGCTGTCTATGC 272
Isolado_5.6               TAACAAGGGATGCTGTCTATGC 272
Isolado_18.1              TAACAAGGGATGCTGTCTATGC 272
Isolado_90.71             TAACAAGGGATGCTGTCTATGC 272
Isolado_37.1              TAACGAGGGATGCTGTCTATGC 272
Isolado_81.1              TAACGAGGGATGCTGTCTATGC 272
GarCLV_Taiwan_AB004566    TAACCAGGGATGCTGTTTATGC 272
Isolado_6.1               TAACAAGGGACGCTGTTTATGC 272
```

Continua

```
Isolado_26.2               TAACAAGGGACGCTGTTTATGC 272
Isolado_73.1               TAACAAGGGACGCTGTTTATGC 272
Isoldo_68.3                TAACAAGGGACGCTGTTTATGC 272
GarCLV_Korea_DQ520092      TAACAAGGGACGCTGTTTATGC 272
GarCLV_Brasil_AF228416     TAACAAGGGACGCTGTTTATGC 272
Isolad_55.3                TAACAAGGGATGCTGTTTATGC 272
Isolado_69.1               TAACAAGGGATGCTGTTTATGC 272
Isolado_75.1               TAACAAGGGATGCTGTTTATGC 272
Isolado_76.1               TAACGAGGGATGCTGTTTATGC 272
GarCLV_Holanda_AB004804    TAACAAGGGATGCTGTTTATGC 272
                           **** ***** ***** *****
```

Figura 7 – Alinhamento da sequência de *Shallot latent virus*, correspondente a região completa da capa protéica. Em vermelho o códon de iniciação e em amarelo o códon de terminação da CP.

```
SLV_AB004567  ATGACGAACGAAGAAGAAGAACTCAACAGAGTGAAGAATTTGCCCACGCGCGACCCGGGG 60
SLV_DQ520093  ATGACGAACGAAGAAGAAGAACTCAACAGAGTGAAGAATTTGCCCACGCGCGACCCGGGG 60
Isolado_95.2  ATGACAAACGAAGAAGAAGAACTCAACAGAGTTAAGAATTTGCCCATGCGCGACCCGGGG 60
Isolado_66.1  ATGACAAACGAAGAAGAAGAACTCAACAGAGTTAAGAATTTGCCCATGCGCGACCCGGGG 60
SLV_AB004802  ATGGCAAACGAAGAAGAAGAACTCAGCAGATTGAATAATTTGCCCACTCGCGATCCGGAG 60
              *** * ******************* **** * ** **********  ***** **** *

SLV_AB004567  ACAGCACCCGATGGGGAACGCAGTAAGGCCGTTAATGATGTTGGTGTCATGGAACGCGAA 120
SLV_DQ520093  ACAGCACCTGATGGGGAACGCAGTAAGGCCGTTAATGATGTTGGTGTCATGGAACGCGAA 120
Isolado_95.2  ACACTACCCGATGGGGAACGCAGTAAGGCCGTCAATGATGTTGGTGTTATGGAACGTGAA 120
Isolado_66.1  ACACTACCCGATGGGGAACGCAGTAAGGCCGTCAATGATGTTGGTGTTATGGAACGTGAA 120
SLV_AB004802  ACTGTACCCGAAGGGGAGCGCAGTAAGGCTGTTAATGATGTTGGCGTTATGGATCGTGAA 120
              **   *** ** ***** *********** ** *********** ** ***** ** ***

SLV_AB004567  GGCTTTGAGGCCGTTCTTCGTAGGAGTGAAAGTAGATTCAACAAGCTTAAAGAAAAGTGC 180
SLV_DQ520093  GGCTTTGAGGCCGTTCTTCGTAGGAGTGAAAGTAGATTCAACAAGCTTAAAGAGAAGTGC 180
Isolado_95.2  GGCTTCGAAGCCGTCCTTCGTAGAAGTGAAAGTAGATTCAACAAACTTAAAGAGAAGTGC 180
Isolado_66.1  GGCTTCGAAGCCGTCCTTCGTAGAAGTGAAAGTAGATTCAACAAACTTAAAGAGAAGTGC 180
SLV_AB004802  GGCTTCGAGGCCGTTCTTCGTAGGAGTGAAAGTAGATTCAACAAACTTAAGGAGAAGTGC 180
              ***** ** ***** ******** ******************** ***** ** ******

SLV_AB004567  ATAGCTGAATTGTCTAGCATAAATGTGACGAATTGTGGATGGGAATCCGGACGCCCCAAA 240
SLV_DQ520093  ATAGCTGAATTGTCTAGCATAAATGTGACGAATTGTGGATGGGAATCCGGACGCCCCAAA 240
Isolado_95.2  ATGGCTGATTTATCTAGCATTAATGTGACGAATTGTGGATGGGAATCCGGACGCCCGAAA 240
Isolado_66.1  ATGGCTGATTTATCTAGCATTAATGTGACGAATTGTGGATGGGAATCCGGACGCCCGAAA 240
SLV_AB004802  TTAGCAGAATTATCTAGCATAAATGTGACGAATTGCGGATGGGAATCTGGACGCCCCAAA 240
               * ** ** ** ******** ************** *********** ******** ***

SLV_AB004567  GCACAGCTTGCCGATAGTCTTAAAGGGGATGCATCAAATATTTTCACCCGACCCTCCATG 300
SLV_DQ520093  GCACAGCTTGCCGATAGTCTTAAAGGGGATGCGTCAAATATTTTCACTCGACCCTCTATG 300
Isolado_95.2  GCTCAGCTCGCAGATAGTCTTAAAGGGGATGCTTCAAATATTTTCACCCGTCCCTCCATG 300
Isolado_66.1  GCTCAGCTCGCAGATAGTCTTAAAGGGGATGCTTCAAATATTTTCACCCGTCCCTCCATG 300
SLV_AB004802  GCTCAGCTCGCCGATAGTCTTAAAGGGGATGCTTCGAATATTTTCACCCGTCCCTCCATG 300
              ** ***** ** ******************** ** *********** ** ***** ***

SLV_AB004567  GATGCACTTTTGGTACGGAACTACGCGCCTGAAAGCAATAATCTGGCAACTGCTGAAGAA 360
SLV_DQ520093  GATGCACTTTTGGTACGGAACTACGCACCTGAAAGCAATAATCTGGCAACTGCTGAAGAA 360
Isolado_95.2  GATGCGCTTTTGGTACGGAACTACGCACCTGAGAGTAATAATCTGGCGACCGCCGAGGAA 360
Isolado_66.1  GATGCGCTTTTGGTACGGAACTACGCACCTGAGAGTAATAATCTGGCGACCGCCGAGGAA 360
SLV_AB004802  GACGCACTTTTGGTACGGAACTACGCACCTGAAAGTAATAATCTGGCGACCGCTGAAGAA 360
              ** ** ******************** ***** ** *********** ** ** ** ***
```

Continua

```
SLV_AB004567  TTGGCAAAAATATCCGCCAAGGTACAGGCTCTAGGTGCACCGGAAGAGTGTCTAGCTGAA 420
SLV_DQ520093  TTGGCGAAAATATCCGCCAAGGTACAGGCTCTAGGTGCACCGGAAGAGTGTCTAGCTGAA 420
Isolado_95.2  TTGGCGAAAATATCCGCTAAAGTGCAGGCTCTAGGCGCACCGGAAGAGTGCCTTGCTGAA 420
Isolado_66.1  TTGGCGAAAATATCCGCTAAAGTGCAGGCTCTAGGCGCACCGGAAGAGTGCCTTGCTGAA 420
SLV_AB004802  TTAGCAAAAATTTCTGCCAAAGTGCAGGCTCTAGGTGCGCCAGAAGAGTGTCTTGCTGAA 420
              ** ** ***** ** ** ** ** *********** ** ** ******** ** ******

SLV_AB004567  GTGTTCTGGGACATTTGCATGTATTGCACTACGGCCGGGAGTTCGCCAAATGTGAACCCT 480
SLV_DQ520093  GTGTTCTGGGACATTTGCATGTATTGCACTACAGCCGGGAGTTCGCCAAATGTGAACCCT 480
Isolado_95.2  GTGTTCTGGGACATTTGCATGTATTGCACCACAGCCGGGAGTTCGCCCAATGTGAACCCT 480
Isolado_66.1  GTGTTCTGGGACATTTGCATGTATTGCACCACAGCCGGGAGTTCGCCCAATGTGAACCCT 480
SLV_AB004802  GTGTTCTGGGACATTTGCATGTATTGCACTACAGCCGGGAGTTCGCCAAATGTGAACCCT 480
              ****************************** ** ************** ************

SLV_AB004567  AAAGGGACCATCTCTGTCGGTGGTAAGGTTGTGACTAGGGACATGGTGGTCGCCGTCATC 540
SLV_DQ520093  AAAGGGACCATCTCTGTCGGTGGTAAGGTTGTGACTAGGGACATGGTAGTCGCCGTCATT 540
Isolado_95.2  AAAGGGACCATCTCTGTCGGTGGTAAGGTTGTAACTAGGGACATGGTGGTCGCCGTCATT 540
Isolado_66.1  AAAGGGACCATCTCTGTCGGTGGTAAGGTTGTAACTAGGGACATGGTGGTCGCCGTCATT 540
SLV_AB004802  AAAGGGACCATCTCTGTCGGTGGTAAGGTGGTAACTAGGGACATGGTGGTAGCCGTTATC 540
              ****************************** ** ************** ** ***** **

SLV_AB004567  AAGGAGTACTCAACGCTGCGACAGGTCTGCCGTTGTTACGCGCCCGTTGTCTGGAATTAC 600
SLV_DQ520093  AAGGAGTACTCAACGCTGCGACAGGTCTGCCGTTGTTACGCGCCCGTTGTCTGGAATTAC 600
Isolado_95.2  AAGGAATACTCAACGCTACGACAGGTTTGCCGTTGTTACGCGCCCGTTGTTTGGAATTAC 600
Isolado_66.1  AAGGAATACTCAACGCTACGACAGGTTTGCCGTTGTTACGCGCCCGTTGTTTGGAATTAC 600
SLV_AB004802  AAGGAATACTCAACACTACGACAGGTTTGCCGCTGTTACGCGCCCGTCGTTTGGAATTAC 600
              ***** ******** ** ******** ***** ************** ** *********

SLV_AB004567  ATGTTATTGAATGAGCAACCGCCCGCTAATTGGGACGCAAAGGGGTTCACTGAAAACACT 660
SLV_DQ520093  ATGTTATTGAATGAGCAACCGCCCGCTAATTGGGACGCAAAGGGGTTTACTGAAAACACT 660
Isolado_95.2  ATGTTATTGAATGAGCAACCGCCCGCTAATTGGGACGCGAAGGGGTTCACTGAGAACACT 660
Isolado_66.1  ATGTTATTGAATGAGCACCCGCCCGCTAATGGGGACGCGGAGGGGGTCACTGAGAACACT 660
SLV_AB004802  ATGTTATTGAATGAACAACCGCCTGCTAATTGGGACGCAAAGGGGTTCACCGAAAACACT 660
              ************** ** ***** ****** *******  ***** * ** ** ******

SLV_AB004567  AAATATGCTGCTTTTGATACTTTCGATGCGGTGACGAACAAGGCTGCAATCCAACCGCTG 720
SLV_DQ520093  AAATATGCTGCTTTTGATACCTTCGATGCGGTGACGAACAAGGCTGCAATCCAACCGCTG 720
Isolado_95.2  AAATATGCCGCTTTTGATACCTTCGATGCGGTTACTAACAAAGCTGCAATCCAACCGCTG 720
Isolado_66.1  AAATATGCCGCTTTTGATACTTTCGATGCGGTAACTAACAAAGCTGCAATCCAACCGCTG 720
SLV_AB004802  AAATATGCTGCTTTTGATACCTTCGATGCGGTAACTAACAAGGCTGCAATCCAACCGCTA 720
              ******** *********** *********** ** ***** *****************

SLV_AB004567  GAAGGCCTGATAAGGGCCCCGACTGACGCTGAACGCATTGCTTTCGCAACACATAAGAAG 780
SLV_DQ520093  GAAGGCCTGATAAGGGCCCCGACTGATGCTGAACGCATTGCTTTCGCAACACATAAGAAG 780
Isolado_95.2  GAAGGCCTGATAAGGGCCCCGACTGACGCTGAACGCATCGCTTTCGCGACTCACAAGAAG 780
Isolado_66.1  AAAGGCCTGATAAGGGCCCCGACTGACGCTGAACGCATCGCTTTCGCGACTCACAAGAAG 780
SLV_AB004802  GAAGGCCTCATAAGGGCCCCGACTGACGCTGAACGCATTGCTTTCGCAACACACAAGAAG 780
               ******* ***************** *********** ******** ** ** ******

SLV_AB004567  TTAGCCCTTGCAAAGAATTCACAAAATTCCCTATACGCCAACACCTCCGCTGAGGTCACT 840
SLV_DQ520093  TTAGCCCTTGCAAAGAATTCACAAAATTCCCTATACGCCAACACCTCCGCTGAGGTCACT 840
Isolado_95.2  TTGGCCCTTGCGAAGAATTCACAAAATTCCCGATACGCCAACACCTCTGCTGAGGTCACT 840
Isolado_66.1  TTGGCCCTTGCGAAGAATTCACAAAATTCCCGATACGCCAACACCTCTGCTGAAGTCACT 840
SLV_AB004802  CTAGCTCTTGCGAAGAATTCACAAAATTCTCGATACGCAAATACTTCTGCTGAGGTCACT 840
               * ** ***** ***************** * ****** ** ** ** ***** ******

SLV_AB004567  GGAGGATTCTTCGGACGCTTTCCTAAAAACAATTTTAGAGAGAATCGATGTTGA 894
SLV_DQ520093  GGAGGATTCTTCGGATGCTTTCCTAAAAACAATTTCAGAGAGGATCGATGTTGA 894
Isolado_95.2  GGAGGATTCTTCGGATGCTTTCCTAAAAACAACTTTAGAGAAAGTCGATGTTGA 894
Isolado_66.1  GGAGGATTCTTCGGATGCTTTCCTAAAAACAACTTTAGAGAAAGTCGATGTTGA 894
SLV_AB004802  GGAGGATTCTTTGGATGCTTTCCTAAAAACAACTTTAGAGAGAATCGATGTTGA 894
              *********** *** **************** ** *****   **********
```

Quadro 5 – Porcentagem de identidade de nucleotídeos (diagonal superior) e aminoácidos (diagonal inferior) correspondente a região parcial da proteína capsidial de GarCLV.

	5.3	**5.6**	**6.1**	**18.1**	**26.2**	**37.1**	**55.3**	**68.3**	**69.1**	**73.1**	**75.1**	**76.1**	**81.1**	**90.71**	**AB 004804**	**AB 004566**	**DQ 520092**	**AF 228416**
5.3		97	85	97	84	97	87	87	87	85	87	85	95	96	89	90	87	87
5.6	98		86	97	85	97	88	88	88	86	88	87	95	96	89	89	87	88
6.1	97	96		85	99	85	91	95	91	99	91	88	84	85	91	87	94	93
18.1	100	98	97		85	98	88	87	88	85	88	86	97	97	90	89	87	87
26.2	97	96	100	97		84	90	95	90	99	90	88	84	86	91	87	94	92
37.1	100	98	97	100	97		88	87	88	85	88	87	98	97	90	89	87	87
55.3	100	98	97	100	97	100		94	100	91	100	90	88	88	91	88	93	93
68.3	98	97	98	98	98	98	98		94	95	94	90	87	88	94	90	97	97
69.1	100	98	97	100	97	100	100	98		91	100	90	88	88	91	88	93	93
73.1	97	96	100	97	100	97	97	98	97		91	88	84	85	91	87	94	93
75.1	100	98	97	100	97	100	100	98	100	97		90	88	88	91	88	93	93
76.1	96	95	98	96	98	96	96	97	96	98	96		86	86	91	90	88	89
81.1	100	98	97	100	97	100	100	98	100	97	100	96		95	89	89	86	86
90.71	100	98	97	100	97	100	100	98	100	97	100	96	100		90	88	88	88
AB004804	98	97	98	98	98	98	98	100	98	98	98	97	98	98		91	93	93
AB004566	100	98	97	100	97	100	100	98	100	97	100	96	100	100	98		88	88
DQ520092	98	97	98	98	98	98	98	100	98	98	98	97	98	98	100	98		94
AF228416	98	97	98	98	98	98	98	100	98	98	98	97	98	98	100	98	100	

Quadro 6 – Porcentagem de identidade de nucleotídeos (diagonal superior) e aminoácidos (diagonal inferior) correspondente a região completa da proteína capsidial de SLV.

	AB 004567	DQ 520093	AB 004802	Isol. 95.2	Isol. 66.1
AB004567		98	91	92	91
DQ520093	99		90	92	91
AB004802	96	96		91	90
Isol. 95.2	97	97	95		99
Isol. 66.1	95	96	94	98	

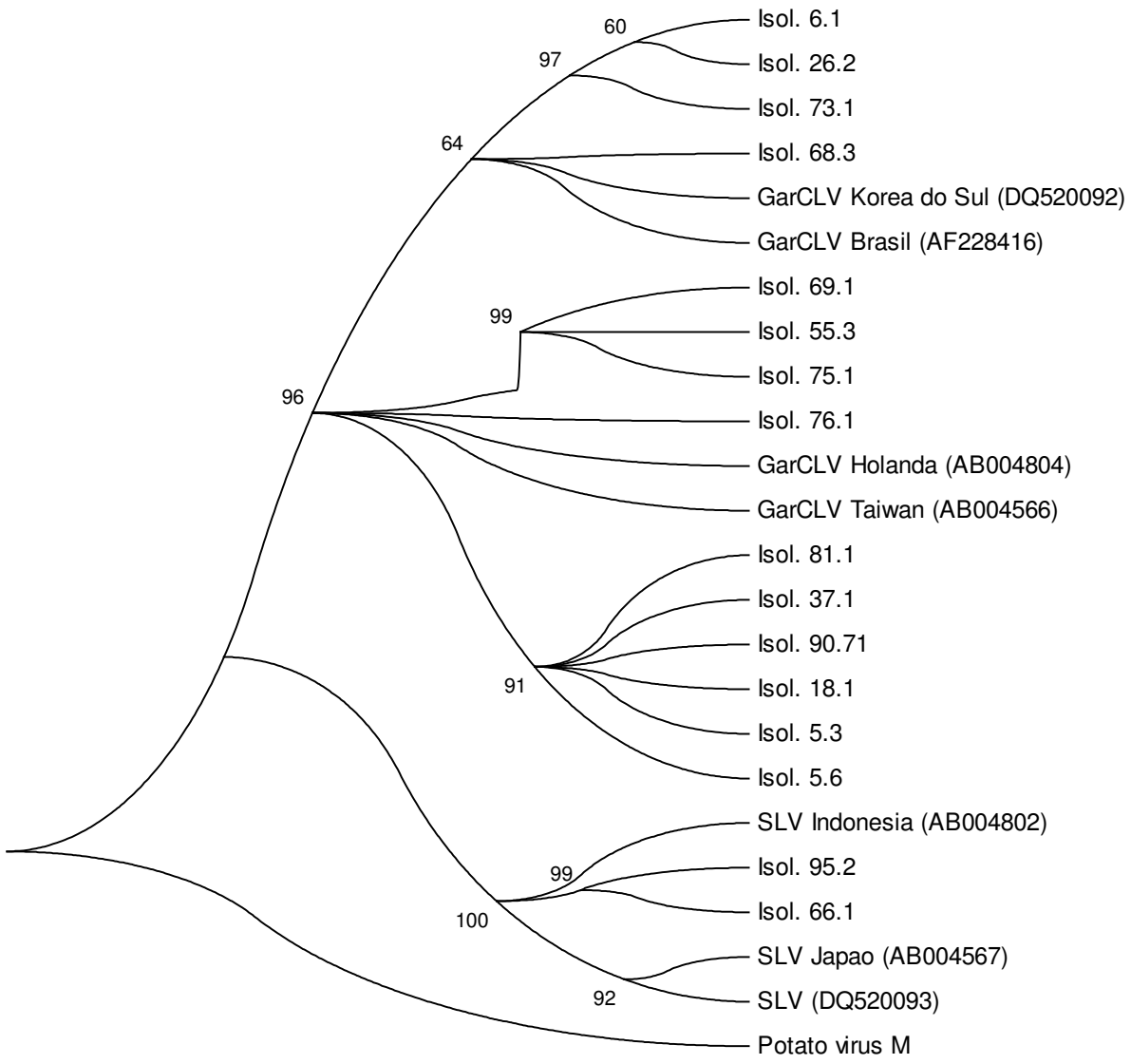

Figura 8 – Árvore filogenética da sequência de nucleotídeos da porção da proteína capsidial de diferentes isolados de GarCLV e SLV. A árvore foi construída utilizando neighbor-joining, com valor de bootstrap de 2000. *Potato virus M* foi utilizado como outgroup.

7. CONCLUSÕES

- Há predominância da ocorrência de potyvirus em relação a carlavirus, em plantas de alho coletadas nas diferentes regiões do Brasil;
- Não há correlação da ocorrência de carlavirus com as regiões produtoras do País;
- O antissoro comercial para SLV nem sempre é eficiente para detecção.
- Os primers SLV/GCLV 7303 e SLV/GCLV 7665 sintetizados para carlavirus foram eficientes para a detecção em plantas de alho;
- Há variabilidade molecular entre os isolados de carlavirus no Brasil em relação ao sequenciamento da proteína capsidial;
- Constatou-se pela primeira vez a presença de SLV no Brasil.

8. REFERÊNCIAS

ADAMS, M. J.; ACCOTTO, G. P.; AGRONOVSKY, A. A.; BAR-JOSEPH, M.; BOSCIA, D.; BRUNT, A. A.; CANDRESSE, T.; COUTTS, R. H. A.; DOLJA,V. V.; FALK, B. W.; FOSTER, G. D.; GONSALVES, D.; JELKMANN, W.; KARASEV, A.; MARTELLI, G. P.; MAWASSI, M.; MILNE, R. G.; MINAFRA, A.; NAMBA, S.; ROWHANI A.; VETTEN, H. J.; VISHNICHENKO, V. K.; WISLER, G. C.; YOSHIKAWA, N.; ZAVRIEV, S. K. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J. ; DESSELBERG, U.; BALL, L. A. **Virus Taxonomy**: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. California: Elsevier Academica Press, 2005, 1259 p.

AGRIANUAL 2008: **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2008. 502 p.

ANAPA – Associação Nacional dos Produtores de Alho. Consumo de Alho no Brasil, 2009. Disponível em: <http://www.anapa.com.br/principal/images/stories/documentos/consumo_de_alho_no_brasil.pdf>. Acesso em 02 fev. 2009.

ARSHAVA, N. V.; KONAREVA, T. N.; RYABOV, E. V.; ZAVRIEV, S. K. The 42k protein of shallot virus X is expressed in infected *Allium* plants. **Molecular Biology**, Moscow, n. 29, p. 192-198, 1995.

BADGE, J.; BRUNT, A.; DAGLESS, E.; KARAMAGIOLI, M.; PHILLIPS, S.; SEAL, S.; TURNER, R.; FOSTER, G.D. A carlavirus-specific PCR primer and partial nucleotide sequence provides further evidence for the recognition of cowpea mild mottle virus as a whitefly-transmitted carlavirus. **European Journal of Plant Pathology**, v. 102, p. 305-310, 1996.

BARG, E.; LESEMANN, D.E.; VETTEN, H.J. Identification, partial characterization, and distribution of viruses infecting allium crops in South an Southeast Asia. **Acta Horticulturae**, n. 358, p. 251-258, 1994.

BELLARDI, M.G.; MARANI, F.; BETTI, L.; RABITI, A.L. Detection of Garlic common latent virus (GCLV) in *Allium sativum* L. in Italy. **Phytopathology**, v. 34, p.58-61, 1995.

BERTHEAU, Y.; FRECHON, D.; TOTH, I.K.; HYMAN, L.J. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). IN: Perombelon, M. C. M.; van der Wolff. J. M. **Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes.** Dundee:Scottish Crop Research Institute Occasional Publication, 1998.

BOS, L.; HUTTINGA, H.; MAAT, D.Z. *Shallot latent virus*, a new carlavirus. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.84, p.227-237, 1978.

BOS,L. HUIJBERTS, N., CUPERUS, C. Further observations on variation of lettuce mosaic virus in relation to lettuce (*Lactuca sativa*), and a discussion of resistance terminology. **European Journal of Plant Pathology**, v. 100, p. 293-314, 1994.

BRUNT, A.A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M.J., GIBBS, A.J., WATSON, L. AND ZURCHER, E.J. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database, 1996. Disponível em < http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide> . Acesso em 12 jul. 2009.

BURBA, J. L. **Efeitos do manejo alho-semente (*Allium sativum* L.) sobre a dormência, crescimento e produção da cv. Chonan**. 1983, 112 f. Dissertação (Doutorado)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1983.

CARVALHO, M. G. Viroses do alho. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, n.2, p. 299-300, 1981.

CARVALHO, M. G. Viroses do alho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 12, n. 142, p. 41-46, 1986.

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

CLARCK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v.34, p. 475-483, 1977.

CONCI, V.; NOME, S. F.; MILNE, R. G. Filamentous viruses of garlic in Argentina. **Plant Disease**, v. 76, p. 594-596, 1992.

DANIELS, J. Occurence of virus in garlic in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, n 24, p. 91, 1999.

DELECOLLE, B.; LOT, H. Viroses de l'ail: mise en evidence et assais de characterization par immunoélectromicroscopie d'um complex de trios virus chez différents populations dáil atteints de mosaique, 1981. In: VAN DIJK, P. Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. **Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 99, p. 233-257, 1993.

DIEKMANN, M. *Allium* spp. FAO/IPGRI, Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm, 1997. In: KLUKACKOVÁ, J.; NAVRÁTIL, M.; DUCHOSLAV, M. Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.3, n.4, p.97-100, 2007.

DOVAS, C.I.; HATZILOUKAS, E.; SALOMON, R.; SHIBOLETH, Y.; KATIS, N.I. Incidence of viruses infecting *Alliums* spp. in Greece. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p. 677-684, 2001.

DUSI, A.N.; FAJARDO, T.V.M.; CUPERTINO, F.P. Serological identification of garlic (*Allium sativum* L.) viruses in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**. v.19 (supl.), p.298, 1994.

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

FAJARDO, T.V.M. **Estudo da degenerescência por viroses e caracterização molecular do complexo viral da cultura do alho (***Allium sativum L.***)**. 1998, 121 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)–Universidade de Brasília, Brasília, 1998.

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

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

FILGUEIRA, F. A. R. **Manual de Olericultura:** cultura e comercialização das hortaliças. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1972, 451 p.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura:** agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3 ed. Viçosa: Editora UFV, 2007. Cap. 15, p.255-278.

FROSI, J.F.; YOKOYAMA, S. Propriedades químicas e medicinais do alho. In: **A cultura do alho em Santa Catarina.** Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária, Florianópolis, 1983. p. 75-78.

GRAICHEN, K.; LEISTNER, H.U. Zwiebrlgelbstreifen virus (*Onion yellow dwarf virus*) verursacht Knoblauchmosaik, 1987. In: VAN DIJK, P. Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. **Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 99, p. 233-257, 1993.

HOLLINGS, M.; BRUNT, A. A. **Potyvirus Group.** In: CMI/A. A. B. Description of Plant Viruses, n. 245, 1981.

HULL, R. Plant diseases caused by viruses. In: HULL, R. **Matthews' Plant Virology**. 4th ed, Academic Press, 2001. Cap.14, p. 723-792.

KITAJIMA E.W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. **Journal of Electron Microscopy**, v. 14, p. 119-121, 1965.

KOENIG, R. Carlavirus group, 1982. In: PAVAN, M.A. **Viroses em alho nobre:** identificação, estabelecimento de métodos eficientes para obtenção de plantas livres de vírus, seleção de clones assintomáticos em campo e avaliação comparativa do desempenho em condições controladas. 1998, 116 f. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia Geral)–

Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 1998.

KLUKACKOVÁ, J.; NAVRÁTIL, M.; DUCHOSLAV, M. Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.3, n.4, p.97-100, 2007.

LORDELLO, L.G. 1979. In: BECKER, W.F. Doenças causadas por nematóides em alho e cebola. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Eds) **Controle de doenças de plantas**. v.1. Viçosa: Editora UFV, 2000. Cap.3, p.83-101.

LUNELLO, P.; MANSILLA, C.; CONCI, V.; PONZ, F. Ultra-sensitive detection of two garlic potyvirus using real-time fluorescent (Taqman®) RT-PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v.118, p.15-21, 2004.

MAESO, C.; PAGANI, C.; CONCI, V.C.; MIRABELLE, L. Studies on viruses affecting garlic in Uruguay. **Acta Horticulturae**, p.617-622, 1997.

MAKISHIMA, N. Alho, um condimento de Cr$ 32 bilhões, 1982. In: SILVA, A.C.F.; MULLER, J.J.V.; CARDOSO, V.T.M. Aspectos produtivos e econômicos da cultura do alho. In: **A cultura do alho em Santa Catarina**. Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária, Florianópolis, 1983. p.9-18.

MARYS, E.; CARBALLO, O.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M.L. Isolation and characterization of viruses present in four clones of garlic (*Allium sativum*) in Venezuela. **Journal of Phytopathology**, v. 142, p.227-234, 1994.

MASCARENHAS, M.H.T. Clima, cultivares, épocas de plantio e alho planta. **Informe Agropecuário**, v. 48, n. 4, p. 15-24, 1978.

MASSOLA JR., N. S.; JESUS JR., W. C.; KIMATI, H. Doenças do alho de da cebola (*Allium sativum* e *A. cepa*). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**: doenças de plantas cultivadas. 4 ed., v. 2. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. Cap. 9, p. 53-63.

MAVRIC, I.; RAVNIKAR, M. A Carlavirus serologically closely releated to *Carnation latent virus* in Slovenian garlic. **Acta Agriculturae Slovenica**, v.2, n. 85, p. 342-349, 2005.v.39, n.8, p.735-740, 2005.

MELO FILHO, P.A.; TANABE, C.M.N.; DUSI, A.N.; TORRES, A.C.; ÁVILA, A.C.; BUSO, J.A.; RESENDE, R.O. Degeneration of garlic (*Allium sativum* L.) plants caused by virus infection after four sequential field generations. **Virus Reviews & Research**. v.5, n.2, p.198, 2000.

MELO FILHO, P.A.; DUSI, A.N.; BUSO, J.A.; TORRES, A.C.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Degeneration of garlic plants caused by virus infection after five sequential field generations. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.28, n.1, p.141, 2002.

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.

MELO FILHO, P.A.; DUSI, A.N.; COSTA, C.L.; RESENDE, R.O. Colonização de plantas de alho por *Neotoxoptera formosana* no DF. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.929-930, 2005.

MENEZES SOBRINHO, J.A. Origem e Botânica do Alho. **Informe Agropecuário**, v.4, n.48, p.14, 1978.

MENEZES SOBRINHO, J. A.; LOPES, C. A.; REIFSHNEIDER, F. J. B.; CHARCHAR J. M.; CRISÓSTOMO, L. A.; CARRIJO, O. A.; BARCOSA, S. **A cultura do alho**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. Brasília, 1993.

MESSIAEN, C.M. Thirty years of France experience in production of disease-free garlic and shallot mother bulbs. **Acta Horticulturae**,v. 358, p.275-279, 1994.

MÜLLER, J.J.V.; SILVA, A.C.F. Clima, cultivares e épocas de plantio para o alho. In: **A cultura do alho em Santa Catarina**. Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária, Florianópolis, 1983. p.22-26.

PAVAN, M.A. **Viroses em alho nobre:** identificação, estabelecimento de métodos eficientes para obtenção de plantas livres de vírus, seleção de clones assintomáticos em campo e avaliação comparativa do desempenho em condições controladas. 1998, 116 f. Tese (Livre-Docência em Fitopatologia Geral)–Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 1998.

PEÑA-IGLESIAS, A. El ajo: virosis, fisiopatias y selección clonal y sanitária. II parte cientifico-experimental, 1988. In: PAVAN, M.A. **Viroses em alho nobre:** identificação, estabelecimento de métodos eficientes para obtenção de plantas livres de vírus, seleção de clones assintomáticos em campo e avaliação comparativa do desempenho em condições controladas. 1998, 116 f. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia Geral)–Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 1998.

REGINA, S. M. Alho: Agora pode dar certo. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 12, n. 142, p. 56-64, 1986.

ROBBS, C.F.; RODRIGUES NETO, J.; RIBEIRO, R.L.D.; KIMURA, O.A. 1981. In: ROMEIRO, R.S. Doenças causadas por bactérias em alho e cebola. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Eds) **Controle de doenças de plantas**. v.1. Viçosa: Editora UFV, 2000. Cap.2, p.43-81.

SALOMON, R. Virus Diseases in Garlic and the propagation of virus-free plants. In: RABINOWITCH, H. D.; CURRAH, L.(Eds.) **Allium Crop Science:** Recent Advances. New York: CABI, 2002. Cap.13, p. 311-327.

SATURNINO, H. M.; CRUZ FILHO, J. Doenças da cebola. **Informe Agropecuário**, v. 6, n. 62, p. 47-59, 1980.

SOSA, C.; MUNÕZ, J.; NAVELINO, P.; GONZÁLEZ, H. Evaluation of re-infection by virus in virus-free garlic Rosado Paraguayo grow in Cordoba, survey of vectors. In: BURBA, J.L.; GALMARINI, C.R. (Eds). First International Symposium on Edible *Alliaceae.* **Acta Horticulturae**. V.433, 1997

TAKAICHI, M.; YAMAMOTO, M.; NAGAKUBO, T.; OEDA, K. Four garlic viruses identified by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction and their regional distribution in Northern Japan. **Plant Disease**, vol. 82, n.6, p.694-698, 1998.

TSUNEYOSHI, T; MATSUMI, T; , DENG, T. C.; SAKO, I.; SUMI, S. Differentiation of *Allium* carlaviruses isolated from different parts of the world based on the viral coat protein sequence. **Archives of Virology**, v. 143, p. 1093-1107, 1998.

VAN DIJK, P. Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. **Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 99, p. 233-257, 1993.

WALKEY, D.G.A.; WEBB, M.J.W.; BOLLAND, C.J.; MILLER, A. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. **Journal of Horticultural Science**, v.62, p.211-220, 1987.

WALKEY, D.G.A.; ANTILL, D.N. Evaluation of viruses-free and virus-infected garlic (*Allium sativum* L.). **Journal of Horticultural Science**. v.64, n.1, p.60, 1989.

WRIGHT, R. C.; PEACOCK, W. Influence of storage temperatures on the rest period and dormancy of popatoes, 1934. In: PAVAN, M.A. **Viroses em alho nobre:** identificação, estabelecimento de métodos eficientes para obtenção de plantas livres de vírus, seleção de clones assintomáticos em campo e avaliação comparativa do desempenho em condições controladas. 1998, 116 f. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia Geral)–Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 1998.

ZERBINI, F.M.; CARVALHO, M.G.; ZAMBOLIM, E.M. Movimento de vírus na planta. In: ZERBINI, F.M.; CARVALHO, M.G.; ZAMBOLIM, E.M. **Introdução à Virologia Vegetal.** 2 ed.,Viçosa: UFV, 2006. Cap.7, p.71-86

APÊNDICE 1

Alinhamento de nucleotídeos realizado com o programa MEGA 4.0 entre seqüências de GarCLV, SLV e GLC (estirpe de SLV), depositadas no GenBank. O número de acesso de cada seqüência está especificada na frente de seu nome. Em azul a região de anelamento do primer GCLV 7114; em amarelo a região de anelamento do primer SLV 7180; em vermelho a região de anelamento dos primer SLV/GCLV 7307, GCLV 7303 e SLV 7303; e em verde a região de anelamento do primer antisenso SLV/GLCV 7665.

```
GCLV/K2-DQ520092    TGGCTTCAGAGAGAAGTGATGCTGAACGCC-GGAAAAATGATGCAGCTGT 49
GCLV/CP-AF538951    TTCTTGGAGAGATCGGT-AAGCAGAGCGCCCGCAAAAATGAAGCAGCCAT 49
GCLV/CP-AB004805    AGGCCTCAGAGAGAAGCGAAGTGACACGCC-GGAAAAATGACGCAGCAGT 49
GCLV/CP-AB004804    AGGCTTCAGAGAGAAGCGAAGTGACACGCC-GGAAAAATGATGCAGCAGT 49
GCLV/CP-AF228416    TGGCTTCAGAGCGAGGCGATGCTGAACGAC-GGAAAAATGATGCAGCAGT 49
GLV/CP-AB004686     TTTACAGCGCTCTAAATTGATATTATGACAAACGAAGAAGAAGAACTCAA 50
GLV/CP-AB004684     TACACAGCGCTCTAAATTGATATTATGACTAACGAAGAAGAAGAACTCAG 50
GLV/YH3-AJ292228    TACACAGCGCTCTAAATTGATATTATGGCTAACGAAGAAGAAGAACTCAG 50
SLV-AB004457        TTAACAGCATTCTGTTTTGATATTATGGCTAAGGAAGCAGAAGAAATCAG 50
SLV-AB004456        TTAACAGCGTTCTGAATTGATATTATGGCTAGGGAAGCAGAAGAACTCGG 50
SLV-AB004544        TTAACAGCATTCTGTTTTGATATTATGGCTAAGGAAGCAGAAGAACTCAG 50
                                                      **   ** * *

                         GCLV 7114 ──►
GCLV/K2-DQ520092    GAGAGCTAGGCAGGATGCTGCTATCGATTCTGAGGAA---CCTGCTGACG 96
GCLV/CP-AF538951    TAGGGCTAGGCAGGATGCCGCCATCGATTCTGAGGAG---CCTGCCGATG 96
GCLV/CP-AB004805    GAGAGCTAGGCAAGATGCTGCTATCGATTCTGAGGAA---CCTGCGGATG 96
GCLV/CP-AB004804    GAGAGCTAGGCAGGATGCTGCTATCGATTCTGAGGCG---CCTGTAGATG 96
GCLV/CP-AF228416    GAGAGCTAGGCAGGATGCTGCAATCGATTCTGAGGAA---CCTGCTGACT 96
GLV/CP-AB004686     CAGATTGCAGAACTTACCCACACGTGACCCGGGGACGGTTCCCGACGGGG 100
GLV/CP-AB004684     TAACGTGCAGAACTTGCCGACTCGCGATCCAGGGACTATATCCGAGCGTG 100
GLV/YH3-AJ292228    TAACGTGCAGAACTTGCCGACTCGCGATCCAGGGACTATCCCCGAGCGTG 100
SLV-AB004457        T---------AAGTTGCCGACTCGTGACCCCGGTACTATCCCTGAGCGCG 91
SLV-AB004456        T---------AACTTGCCAACTCGCGATCCTGGAACGATTCCTGAGCGCG 91
SLV-AB004544        T---------AAGTTGCCGACTCGCGACCCCGGTACTATCCCTGAGCGCG 91
                              *     *  *    **  * *         * *

GCLV/K2-DQ520092    TGCAAGAGACGAGCGTTAATGATGTTGATCTGCGTCAAATGGAAAATAGG 146
GCLV/CP-AF538951    TGCTAGAAACGAGCGTTAATGATGTTGACCTGCGTCAAATGGAAAACAGA 146
GCLV/CP-AB004805    TGCATGACACGAGCGTTAATGATGTTGATCTGCGTCAAATGGAAAATAGA 146
GCLV/CP-AB004804    TGCAAGAGACGAGTGTTAATGATGTTGATCTGCGTCAAATGGAGAATCGG 146
GCLV/CP-AF228416    TGCAAGAAACGAGCGTTAATGATGTTGATCTGCGTCAAATGGAAAATAGG 146
GLV/CP-AB004686     AACGCAGTAAGGCCGTTAATGACGTTGGGGTCATGGATCGCGAAGGCTTT 150
GLV/CP-AB004684     AACGAAACAAAGCAGTAAACGATGTTGGTGTCATGGAACGTGAAGGTTTT 150
GLV/YH3-AJ292228    AACGAAACAAAGCAGTGAATGATGTTGGTGTAATGGAACGTGAAGGTTTT 150
SLV-AB004457        AACGAAACAGGGCAGTTAATGATGTAGGCATTATGGATAGGGAAGGTTTT 141
SLV-AB004456        AACGGAGTAGGTCCGTAAATGATGTTGGCGTCATGGAGAGAGAGGGCTTT 141
SLV-AB004544        AACGAAACAGGACAGTTAATGATGTAGGCATTATGGATAGGGAAGGTTTT 141
                      *     *     ** ** ** ** *   *     *    **
                                          SLV 7180 ──►

GCLV/K2-DQ520092    GTCCAGGAAGCTAAGCGGTTTTTGGAGCGCTTCAACAAGCTTAAGAAGTT 194
GCLV/CP-AF538951    GTCCAGGAAGCTAAGCGGTTTTTGGAGCGCTTCAACAAGCTCAAGAAGTT 194
GCLV/CP-AB004805    GTCCAGGAAGCTAAGCGGTTTTTGGAGCGCTTTAACAAGCTTAAGAAGTT 194
GCLV/CP-AB004804    GTCCAGGAAGCTAAGCGGGTTTTGGAGCGCTTTAACAAGCTTAAGAAGTT 194
```

Continua

```
GCLV/CP-AF228416     GTCCAGGAAGCCAAGCGGTTTTTGGAGCGCTTTAACAAGCTTAAGAAGTT 194
GLV/CP-AB004686      GAGGCCGTCCTCCGTAGGAGTGAAAGTAGATTCAACAAACTCAAAGAGAA 200
GLV/CP-AB004684      GAAGCCGTCCTTCGAAGGAGCGAAAGCAGGTTCAACAAACTTAAGGAGAA 200
GLV/YH3-AJ292228     GAAGCCGTCCTTCGAAGGAGCGAAAGTAGGTTCAACAAACTTAAGGAGAA 200
SLV-AB004457         GAAGCGGTGCTTCGACGCAGTGAGGATCGTTTCAACAAATTAAAGGAGAA 191
SLV-AB004456         GAAGCTGTTCTCCGACGGAGTGAAGATCGATTTAACAAGTTAAAGGAGAA 191
SLV-AB004544         GAAGCGGTGCTTCGACGCAGTGAGGATCGTTTCAACAAATTAAAGGAGAA 191
                     *     *         *           * ** *****  * **  **

GCLV/K2-DQ520092     CCAAGCGGACAATATGACAGCAGGTGAGATCAAGAATGGTGGGTTTGAAA 244
GCLV/CP-AF538951     CCAGGCGGACAATATGACTGCAGGTGAGATCAAGAACGGAGGCTTTGAAA 244
GCLV/CP-AB004805     CCAGGCAGACAATATGACAGCAGGTGAGATCAAGAATGGAGGGTTTGAAA 244
GCLV/CP-AB004804     CCAGGCGGACAATATGACTGCAGGTGAGATCAAGAATGGAGGGTTTGAGA 244
GCLV/CP-AF228416     CCAGGCGGACAATATGACGGCAGGTGAGATCAAGAATGGAGGGTTTGAAA 244
GLV/CP-AB004686      GTGCATAGCCGAATTGTCTAGCATAAATGTAACAAATTGTGGATGGGAAT 250
GLV/CP-AB004684      GTGCATGTCTGAATTGTCTAGCGTGAACGTCACGAACTGCGGGTGGGAGT 250
GLV/YH3-AJ292228     GTGCATGTCTGAATTGTCTAGCGTGAACGTCACGAACTGCGGGTGGGAGT 250
SLV-AB004457         GTGCTTATCTGAGCTATCTAGCGTTAACGTTACCAACTGTGGCTGGGAAT 241
SLV-AB004456         GTGCCTATCTGAATTATCTAGCATCAATGTCACCAATTGTGGTTGGGAAT 241
SLV-AB004544         GTGCTTATCTGAGCTTTCTAGCGTTAACGTTACCAACTGTGGCTGGGAAT 241
                                 *  *  *        *  * *  **  * ** *  **
```

SLV/GCLV 7303 →

```
GCLV/K2-DQ520092     CTGGGAGGCCAAAACTGAACATTGCGGCCAATTTGCGCGGCGACACAGCT 294
GCLV/CP-AF538951     CTGGGAGGCCAAAACTGAACATTGCGGCCAATTTGCGTGGCGACACATCC 294
GCLV/CP-AB004805     CTGGGAGGCCAAAACTGAATATTGCGGCCAATTTGCGCGGCGACACTGCT 294
GCLV/CP-AB004804     CTGGGAGGCCAAAACTGAACATTGCGGCCAATTTGCGCGGCGACACAGCT 294
GCLV/CP-AF228416     CTGGGAGGCCAAAACTGAACATTGCGGCCAATTTGCGTGGCGACACTGCT 294
GLV/CP-AB004686      CTGGACGTCCCAAAGCTCAACTCGCAGATAGTCTCAAAGGGGATGCTTCA 300
GLV/CP-AB004684      CTGGAAGACCCAAAGCTCAGCTTGCTGACAGTCTCAAAGGGGACGCATCG 300
GLV/YH3-AJ292228     CTGGAAGACCCAAAGCTCAGCTCGCTGACAATCTCAAAGGGGATGCTTCA 300
SLV-AB004457         CTGGGAGACCCAAAGCACATTTAGCTGACAGTCTCAAGGGCGATGCTTCT 291
SLV-AB004456         CTGGGAGACCCAAGGCGCATTTGGCTGACAGTCTCAAAGGTGACGCATCT 291
SLV-AB004544         CTGGGAGACCCAAAGCACATTTAGCTGACAGTCTCAAGGGCGATGCTTCT 291
                     ****  * ** **     *  * ** *  * * *    ** **  *  *

GCLV/K2-DQ520092     AACGTATTCACTAGGCCTAGCATGGATGCTTTGATAGCACTGGACTTCAA 344
GCLV/CP-AF538951     AATGTGTTCACTAGACCTAGCATGGATGCTTTGATAGCCCTGGACTTCAA 344
GCLV/CP-AB004805     AATGTATTCACTAGGCCTAGCATGGATGCTTTAATAGCATTGGATTTCAA 344
GCLV/CP-AB004804     AATGTATTCACTAGGCCTAGCATGGATGCTTTAATAGCATTGGATTTCAA 344
GCLV/CP-AF228416     AATGTATTTACTAGGCCCAGCATGGATGCTTTAATAGCATTGGACTTCAA 344
GLV/CP-AB004686      AATATTTTCACTCGTCCCTCAATGGATGCACTTTTAGTGAGGAACTACGC 350
GLV/CP-AB004684      AATATTTTCACTAGGCCCTCCATGGATGCCCTCCTTGTTCGAAATTACGC 350
GLV/YH3-AJ292228     AATATTTTCACTAGGCCCTCCATGGATGCCCTCCTTGTTCGAAATTACGC 350
SLV-AB004457         AACATTTTCACCCGTCCTTCTATGGACGCCCTACTTGTGCGAAATTACGC 341
SLV-AB004456         AACATTTTTACTCGCCCCTCTATGGATGCCTTGCTTGTACGGAACTATGC 341
SLV-AB004544         AACATTTTCACCCGTCCTTCTATGGACGCCCTACTTGTGCGAAATTACGC 341
                     **  * ** **  * **    ***** **  *  * *      * *

GCLV/K2-DQ520092     AGCTGAATCCTTGGCAGTTGCGACTGCAGAAGACCTAGCTGCTATCACTG 394
GCLV/CP-AF538951     GGCTGAATCATTGGCAGTTGCAACCGCTGAAGATCTTGCTGCGATCACTG 394
GCLV/CP-AB004805     AGCTGAATCCTTGGCAGTCGCAACTGCTGAAGACCTAGCTGCTATCACTG 394
GCLV/CP-AB004804     GGCTGAATCATTGGCAGTTGCGACTGCTGAAGACCTTGCTGCCATCACTG 394
GCLV/CP-AF228416     AGCTGAATCCTTGGCTGTCGCGACTGCTGAAGACCTAGCTGCTATCACTG 394
GLV/CP-AB004686      ACCAGAAAGTAATAATCTGGCGACAGCTGAAGAATTGGCAAAAATATCCG 400
GLV/CP-AB004684      ACCTGAAAGTAACAACATGGCGACTGCTGAGGATTTGGCGAAAATCTCCG 400
```

Continua

```
GLV/YH3-AJ292228    ACCTGAAAGTAACAACATGGCGACTGCTGAGGATTTGGCGAAAATCTCAG 400
SLV-AB004457        ACCCGAGAGTAACAACCTAGCGACTGCCGAGGAGCTAGCTAAGATTTCCG 391
SLV-AB004456        TCCTGAGAGTAATAATTTGGCGACGGCTGAAGAACTGGCGAAGATTTCGG 391
SLV-AB004544        ACCCGAGAGTAACAACCTAGCGACTGCCGAGGAGCTAGCTAAGATTTCCG 391
                      * **           * ** ** ** ** **  * **    **  * *

GCLV/K2-DQ520092    CTAAATTTGAACAGCTTGGGGTGCCAACTGAGAGATTAGCACCACTTTGT 444
GCLV/CP-AF538951    CGAAATTCGAACAGCTTGGTGTGCCTACAGAGAGATTAGCTCCTCTTTGT 444
GCLV/CP-AB004805    CTAAATTTGAGCAGCTTGGGGTGCCAACTGAGAGATTAGCTCCACTTTGT 444
GCLV/CP-AB004804    CTAAATTTGAGCAGCTCGGGGTGCCAACTGAGAGATTAGCTCCCCTTTGT 444
GCLV/CP-AF228416    CTAAATTTGAACAGCTTGGGGTGCCAACTGAGAGATTAGCTCCACTTTGT 444
GLV/CP-AB004686     CCAAGGTGCAGGCTCTAGGTGCACCGGAAGAGTGCTTAGCTGAGGTGTTC 450
GLV/CP-AB004684     CCAAAGTACAAGCCCTTGGCGCTCCAGAAGAATGTTTAGCTGAAGTCTTC 450
GLV/YH3-AJ292228    CCAAAGTACAAGCCCTTGGCGCTCCAGAGGAATGTTTAGCTGAAGTCTTC 450
SLV-AB004457        CGAAAGTCCAGGCGCTAGGTGCCCCGGAAGAGTGTTTGGCTGAGGTGTTC 441
SLV-AB004456        CTAAAGTCCAAGCTTTAGGCGCTCCTGAAGAGTGTTTGGCTGAAGTATTT 441
SLV-AB004544        CGAAAGTCCAGGCGCTAGGTGCCCCGGAAGAGTGTTTGGCTGAGGTGTTC 441
                    * **  *  *     * ** *  **    **  * ** **     * *

GCLV/K2-DQ520092    TGGTCGATTGCAAGGTATTGTGCAGATACGAGTTCTTCATATGTAGCTGA 494
GCLV/CP-AF538951    TGGTCGATTGCAAGGTATTGCGCAGACACTAGTTCATCATATGTGGCTGA 494
GCLV/CP-AB004805    TGGTCGGTTGCAAGGTACTGCGCAGATACAAGTTCTTCATATGTAGCTGA 494
GCLV/CP-AB004804    TGGTCGATTGCAAGGTATTGCGCAGATACAAGTTCTTCATATGTGGCTGA 494
GCLV/CP-AF228416    TGGTCGATTGCAAGGTACTGTGCAGATACAAGTTCTTCATATGTGGCTGA 494
GLV/CP-AB004686     TGGGATATTTGCATGTATTGCACTACTGCCGGGAGCTCACCAAACGTGAA 500
GLV/CP-AB004684     TGGGACATCTGCATGTACTGCACCACTGCAGGAAGTTCTCCAAATGTCAA 500
GLV/YH3-AJ292228    TGGGACATATGCATGTACTGCACCACTGCAGGAAGTTCTCCAAATGTCAA 500
SLV-AB004457        TGGGACATCTGTATGTATTGTGCCACTGCTGGTAGTTCTCCCAACGTCAA 491
SLV-AB004456        TGGGACATTTGCATGTATTGCGCCACCGCAGGTAGCTCTCCAAACGTCAA 491
SLV-AB004544        TGGGACATCTGTATGTATTGTGCCACTGCTGGTAGTTCTCCCAACGTCAA 491
                    ***    *    * *** **  *     *  *    **       *   *

GCLV/K2-DQ520092    TCCGAAAGGAACTTTTGAATACCCAGGGGGTGCTATAACAAGGGACGCTG 544
GCLV/CP-AF538951    CCCGAAAGGAACCTTTGAATACCCCGGGGGCGCTATAACTAGGGACGCTG 544
GCLV/CP-AB004805    TCCAAAAGGAACTTTTGAATACCCAGGGGGTGCTATAACAAGGGACGCTG 544
GCLV/CP-AB004804    TCCTAAAGGAACTTTTGAATACCCAGGGGGTGCTATAACAAGGGATGCTG 544
GCLV/CP-AF228416    TCCGAAAGGAACTTTTGAATACCCAGGGGGTGCTATAACAAGGGACGCTG 544
GLV/CP-AB004686     CCCTAAGGGGACTATCTCTGTCGGTGGCAAAGTTGTCACTAGGGATATGG 550
GLV/CP-AB004684     TCCCAAAGGAACTATATCTGTCGGGGGTAAAGTCGTAACTAGGGACATGG 550
GLV/YH3-AJ292228    TCCCAAAGGAACTATATCTGTCGGGGGTAAAGTTGTAACTAGGGACATGG 550
SLV-AB004457        TCCCAAAGGTACCATCTCCGTCGGTGGTAAAGTTGTGACCAGAGACATGG 541
SLV-AB004456        TCCTAAAGGTACTATCTCCGTCGGCGGGAAAGTCGTTACTAGAGACATGG 541
SLV-AB004544        TCCCAAAGGTACCATCTCCGTCGGTGGTAAAGTTGTGACCAGAGACATGG 541
                     ** ** ** **  *      *   **    *   * ** ** **    *

GCLV/K2-DQ520092    TTTATGCCGTCATCAAAGAAGTTACGACCCTGAGGGCTTTCTGCAGAGCT 594
GCLV/CP-AF538951    TTTATGCCGTCATCAAAGAAGTCACGACCCTGAGGGCTTTCTGTCGAGCT 594
GCLV/CP-AB004805    TTTATGCTGTCATCAAAGAAGTCACGACCCTGAGGGCTTTCTGCAGAGCT 594
GCLV/CP-AB004804    TTTATGCTGTCATCAAAGAAGTCACGACCCTGAGGGCTTTCTGTAGAGCT 594
GCLV/CP-AF228416    TTTATGCCGTCATCAAAGAAGTTACGACTCTGAGGGCTTTCTGCAGAGCT 594
GLV/CP-AB004686     TCGTCGCTGTCATTAAGGAATACTCAACGCTACGACAGGTTTGCCGTTGC 600
GLV/CP-AB004684     TAGTAGCAGTAATCAAAGAATACTCTACATTGCGGCAAGTCTGCCGCTGC 600
GLV/YH3-AJ292228    TTGTAGCAGTAATCAAAGAATACTCTACATTGCGACAAGTCTGCCGCTGC 600
```

Continua

```
SLV-AB004457        TTGTGGCTGTCATTAAAGAATACACTACTCTGCGACAATTTTGCCGTTGC 591
SLV-AB004456        TTGTGGCCGTCATTAAAGAATACACGACACTGCGCCAATTTTGCCGTTGC 591
SLV-AB004544        TTGTGGCTGTCATTAAAGAATACACTACTCTGCGACAATTTTGCCGTTGC 591
                    *    ** ** ** ** ***    * **  *  *     * **  *

GCLV/K2-DQ520092    TTCGCACCAGTGGTTTGGAATGAGATGTTAATTGCTAAAAGACCTCCTGC 644
GCLV/CP-AF538951    TTTGCGCCAGTGGTCTGGAATGAAATGTTAATCACTAAACGACCACCTGC 644
GCLV/CP-AB004805    TTCGCACCAGTGGTTTGGAATGAAATGTTAATCGCTAAAAGACCCCCTGC 644
GCLV/CP-AB004804    TTCGCACCAGTGGTTTGGAATGAAATGTTAATTGCTAAAAGACCACCTGC 644
GCLV/CP-AF228416    TTTGCACCAGTGGTTTGGAATGAAATGTTAATCGCTAAAAGACCTCCTGC 644
GLV/CP-AB004686     TACGCGCCCGTTGTTTGGAATTACATGTTATTGAATGAGCAACCGCCCGC 650
GLV/CP-AB004684     TACGCGCCTGTCGTTTGGAATTACATGTTGTTGAATGAACAACCACCCGC 650
GLV/YH3-AJ292228    TACGCGCCTGTCGTTTGGAATTACATGTTGTTGAATGAACAACCACCCGC 650
SLV-AB004457        TACGCACCAGTCGTATGGAATTACATGTTATTAAATGAGCAGCCGCCGGC 641
SLV-AB004456        TACGCGCCAGTCGTATGGAATTACATGCTATTAAACGAGCAGCCTCCAGC 641
SLV-AB004544        TACGCACCGGTTGTATGGAATTACATGTTATTAAATGAGCAGCCGCCGGC 641
                    *  ** ** ** ** ****** * *** *  *     *    ** ** **
```

SLV/GCLV 7665

```
GCLV/K2-DQ520092    ACCAGTGGTTTGGAATGAGATGTTAATTGCTAAAAGACCTCCTGCTGGTT 694
GCLV/CP-AF538951    GCCAGTGGTCTGGAATGAAATGTTAATCACTAAACGACCACCTGCTGGTT 694
GCLV/CP-AB004805    ACCAGTGGTTTGGAATGAAATGTTAATCGCTAAAAGACCCCCTGCTGGTT 694
GCLV/CP-AB004804    ACCAGTGGTTTGGAATGAAATGTTAATTGCTAAAAGACCACCTGCTGGTT 694
GCLV/CP-AF228416    ACCAGTGGTTTGGAATGAAATGTTAATCGCTAAAAGACCTCCTGCTGGCT 694
GLV/CP-AB004686     GCCCGTTGTTTGGAATTACATGTTATTGAATGAGCAACCGCCCGCTAATT 700
GLV/CP-AB004684     GCCTGTCGTTTGGAATTACATGTTGTTGAATGAACAACCACCCGCAAATT 700
GLV/YH3-AJ292228    GCCTGTCGTTTGGAATTACATGTTGTTGAATGAACAACCACCCGCAAATT 700
SLV-AB004457        ACCAGTCGTATGGAATTACATGTTATTAAATGAGCAGCCGCCGGCAAATT 691
SLV-AB004456        GCCAGTCGTATGGAATTACATGCTATTAAACGAGCAGCCTCCAGCTAATT 691
SLV-AB004544        ACCGGTTGTATGGAATTACATGTTATTAAATGAGCAGCCGCCGGCAAATT 691
                     ** ** ** ****** * *** *  *     *    ** ** **    *
```

APÊNDICE 2

Alinhamento da sequência de aminoácidos correspondente a região parcial da proteína capsidial de GarCLV.

```
Isolado_90.71               RGDTSNVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
GarCLV_Taiwan_AB004566      RGDTSNVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
Isolado_81.1                RGDTSNVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
Isolado_75.1                RGDTSNVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
Isolado_69.1                RGDTSNVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
Isolado_55.3                RGDTSNVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
Isolado_37.1                RGDTSNVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
Isolado_18.1                RGDTSNVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
Isolado_5.3                 RGDTSNVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
Isolado_5.6                 RGDTSNVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
Isolado_68.3                RGDTANVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
GarCLV_Holanda_AB004804     RGDTANVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
GarCLV_Korea_DQ520092       RGDTANVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
GarCLV_Brasil_AF228416      RGDTANVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
Isolado_6.1                 RGDTANVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
Isolado_26.2                RGDTANVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
Isolado_73.1                RGDTANVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKFEQLGVPTER 50
Isolado_76.1                RGDTANVFTRPSMDALIALDFKAESLAVATAEDLAAITAKLEQLGVPTER 50
                            ****:************************************:*********

Isolado_90.71               LAPLCWSIARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
GarCLV_Taiwan_AB004566      LAPLCWSIARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
Isolado_81.1                LAPLCWSIARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
Isolado_75.1                LAPLCWSIARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
Isolado_69.1                LAPLCWSIARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
Isolado_55.3                LAPLCWSIARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
Isolado_37.1                LAPLCWSIARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
Isolado_18.1                LAPLCWSIARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
Isolado_5.3                 LAPLCWSIARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
Isolado_5.6                 LAPLCWSIARYCADTSSSYVADPKGTFEYLGGAITRDAVY 90
Isolado_68.3                LAPLCWSIARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
GarCLV_Holanda_AB004804     LAPLCWSIARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
GarCLV_Korea_DQ520092       LAPLCWSIARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
GarCLV_Brasil_AF228416      LAPLCWSIARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
Isolado_6.1                 LAPLCWSVARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
Isolado_26.2                LAPLCWSVARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
Isolado_73.1                LAPLCWSVARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
Isolado_76.1                LAPLCWSVARYCADTSSSYVADPKGTFEYPGGAITRDAVY 90
                            *******:********************* **********
```

APÊNDICE 3

Alinhamento da sequência de aminoácidos correspondente a região completa da proteína capsidial de SLV.

```
GarLV_AB004567   MTNEEEELNRVKNLPTRDPGTAPDGERSKAVNDVGVMEREGFEAVLRRSESRFNKLKEKC 60
GarLV_DQ520093   MTNEEEELNRVKNLPTRDPGTAPDGERSKAVNDVGVMEREGFEAVLRRSESRFNKLKEKC 60
Isolado_95.2     MTNEEEELNRVKNLPMRDPGTLPDGERSKAVNDVGVMEREGFEAVLRRSESRFNKLKEKC 60
SLV_AB004802     MANEEEELSRLNNLPTRDPETVPEGERSKAVNDVGVMDREGFEAVLRRSESRFNKLKEKC 60
                 *:******.*::*** *** * *:*************:**********************

GarLV_AB004567   IAELSSINVTNCGWESGRPKAQLADSLKGDASNIFTRPSMDALLVRNYAPESNNLATAEE 120
GarLV_DQ520093   IAELSSINVTNCGWESGRPKAQLADSLKGDASNIFTRPSMDALLVRNYAPESNNLATAEE 120
Isolado_95.2     MADLSSINVTNCGWESGRPKAQLADSLKGDASNIFTRPSMDALLVRNYAPESNNLATAEE 120
SLV_AB00480      LAELSSINVTNCGWESGRPKAQLADSLKGDASNIFTRPSMDALLVRNYAPESNNLATAEE 120
                 :*:*******************************************************

GarLV_AB004567   LAKISAKVQALGAPEECLAEVFWDICMYCTTAGSSPNVNPKGTISVGGKVVTRDMVVAVI 180
GarLV_DQ520093   LAKISAKVQALGAPEECLAEVFWDICMYCTTAGSSPNVNPKGTISVGGKVVTRDMVVAVI 180
Isolado_95.2     LAKISAKVQALGAPEECLAEVFWDICMYCTTAGSSPNVNPKGTISVGGKVVTRDMVVAVI 180
SLV_AB004802     LAKISAKVQALGAPEECLAEVFWDICMYCTTAGSSPNVNPKGTISVGGKVVTRDMVVAVI 180
                 ************************************************************

GarLV_AB004567   KEYSTLRQVCRCYAPVVWNYMLLNEQPPANWDAKGFTENTKYAAFDTFDAVTNKAAIQPL 240
GarLV_DQ520093   KEYSTLRQVCRCYAPVVWNYMLLNEQPPANWDAKGFTENTKYAAFDTFDAVTNKAAIQPL 240
Isolado_95.2     KEYSTLRQVCRCYAPVVWNYMLLNEQPPANWDAKGFTENTKYAAFDTFDAVTNKAAIQPL 240
SLV_AB004802     KEYSTLRQVCRCYAPVVWNYMLLNEQPPANWDAKGFTENTKYAAFDTFDAVTNKAAIQPL 240
                 ************************************************************

GarLV_AB004567   EGLIRAPTDAERIAFATHKKLALAKNSQNSLYANTSAEVTGGFFGRFPKNNFRENRC 297
GarLV_DQ52009    EGLIRAPTDAERIAFATHKKLALAKNSQNSLYANTSAEVTGGFFGCFPKNNFREDRC 297
Isolado_95.2     EGLIRAPTDAERIAFATHKKLALAKNSQNSRYANTSAEVTGGFFGCFPKNNFRESRC 297
SLV_AB00480      EGLIRAPTDAERIAFATHKKLALAKNSQNSRYANTSAEVTGGFFGCFPKNNFRENRC 297
                 ****************************** ************** ********.**
```

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo