



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**DETECÇÃO DE *Cucumber mosaic virus* EM ALHO-PORÓ
NA REGIÃO AGRESTE DE PERNAMBUCO, BRASIL**

JACKELINE FIGUEIRA DA SILVA

Recife – PE
2014

JACKELINE FIGUEIRA DA SILVA

**DETECÇÃO DE *Cucumber mosaic virus* EM ALHO-PORÓ NA
REGIÃO AGRESTE DE PERNAMBUCO, BRASIL**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador Prof. Dr.: Péricles de Albuquerque Melo Filho

Coorientadora : Dr^a Roseane Cavalcanti dos Santos

**RECIFE-PE
AGOSTO – 2014**

Ficha catalográfica

S586d Silva, Jackeline Figueira da
Detecção de *Cucumber mosaic virus* em alho-poró na
região agreste de Pernambuco, Brasil / Jackeline Figueira
da Silva. – Recife, 2014.
43 f.

Orientador: Péricles de Albuquerque Melo Filho.
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Fitossanidade, Recife, 2014.
Referências.

1. *Allium* 2. Aliáceas 3. Vírus 4. Sorologia I. Melo Filho,
Péricles de Albuquerque, orientador II. Título

CDD 632

**DETECÇÃO DE *Cucumber mosaic virus* EM ALHO-PORÓ NA
REGIÃO AGRESTE DE PERNAMBUCO, BRASIL**

JACKELINE FIGUEIRA DA SILVA

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 05/08/2014

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof^o. Dr. Gilvan Pio Ribeiro

Dr^a. Genira Pereira de Andrade

Dr^a. Roseane Cavalcanti dos Santos (Embrapa Algodão)

**RECIFE-PE
Agosto – 2014**

“... Porque quando estou fraco então sou forte.”

2 Co 12:10

DEDICO

A Deus, a minha mãe Rosangela Figueira da Silva, a minha irmã Janaina Silva, aos meus tios e tias que me apoiaram e incentivaram, em todas as minhas escolhas, e especialmente ao meu pai Antônio Sousa da Silva que tanto amei que de onde estiver tenho certeza que está muito orgulhoso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, a minha família, por todo o suporte emocional.

À UFRPE e ao CNPq pela oportunidade de realização do Curso e pelo suporte financeiro.

Agradeço a meu orientador por toda paciência e dedicação, além de incentivo para que eu finalizasse esse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Expressão Gênica (LABEG), da UFRPE, Felipe Matheus, Gerkson Rodrigues, Thiago Oliveira, e especialmente a três exímias profissionais pela paciência e dedicação no meu treinamento: Jacqueline Pereira, Isabel Gomes e Kalinny Veiga. À professora Roseane Cavalcanti que me ensinou e apoiou em todas as minhas decisões, ao professor Gilvan Pio a sua dedicação e ensino, a Doutora Genira Andrade que fez de tudo para me ajudar e conseguir meus últimos resultados.

Aos meus queridos irmãos de coração que compartilharam momentos inesquecíveis em Recife, Mayumi Inokuti, Claudeana Souza, Michelle Barros, Moara Bandeira e Wilson Junior, a todos os outros amigos que fiz em Recife, desde Paraguaio a Baianos, aos que mesmo distantes nunca deixaram de está ao meu lado nos momentos difíceis, Arinaldo Silva e Cytia Almeida.

Às professoras, Gisele Barata e Denise Lustosa, que ajudaram na minha formação profissional.

Ao professor Sami Michereff e aos professores do programa de Pós Graduação em Fitopatologia, que sempre se mostraram solícitos a me ajudar, e a todos seus funcionários.

Finalmente, agradeço a meus amigos e a todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I - Introdução Geral.....	1
INTRODUÇÃO	2
1. A cultura do alho-poró.....	2
2. Doenças de plantas pertencentes ao gênero <i>Allium</i>	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
CAPÍTULO II - Detecção de <i>cucumber mosaic virus</i> em alho-poró na região agreste de pernambuco, brasil	17
RESUMO	18
ABSTRACT	19
INTRODUÇÃO	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
REFERÊNCIAS	30
CONCLUSÕES GERAIS.....	33

RESUMO GERAL

A cultura do alho-poró (*Allium ampeloprasum* var. *porrum* L.) se destaca mundialmente na culinária por apresentar sabor diferenciado, quando comparado a outras aliáceas. Tem destaque na culinária de vários países como China, Japão e o Brasil. O gênero *Allium* tem como representantes hortaliças cultivadas e ornamentais de importância econômica tais como: alho (*A. sativum* L.), cebola (*A. cepa* L.), cebolinha (*A. fistulosum* L.) e o alho-poró, que dentre as demais aliáceas, é a menos utilizada no mercado nacional, embora a demanda pela gastronomia brasileira seja crescente. A planta é fenotipicamente muito similar ao alho comum sendo, no entanto, mais vigorosa e com um bulbo simples, cuja característica a difere do alho comum. Sua propagação é via sementes e bulbos, este último possibilita uma eficiente disseminação de patógenos, principalmente vírus. Atualmente as viroses são as principais causadoras de doenças na cultura, podendo provocar grande redução da produção. Neste trabalho procedeu-se uma investigação sobre viroses em campos de produção de alho-poró, na região Agreste de Pernambuco, baseando-se em análises sorológicas e moleculares. Plantas de alho-poró apresentando sintomas de vírus e danos por ácaros foram coletadas no município de Vitória de Santo Antão (Pernambuco), na comunidade Natuba, de onde foi extraído RNA total para posterior síntese do cDNA para uso nas reações de RT-PCR. Os primers utilizados na reação foram desenhados a partir de sequências da capa protéica de *Allexivirus*, depositadas no Gen-bank. Os fragmentos amplificados referentes as cinco amostras foram purificados, clonados e posteriormente sequenciados. Após análise das sequências no BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) verificou-se que as amostras dos cinco isolados brasileiros não apresentaram similaridade com as sequências dos gêneros de *Allexivirus* porém, revelaram 100% de homologia com uma parte do RNA1 de *Cucumber mosaic virus* (CMV). Tal resultado pode ser justificado em função da redução na temperatura de anelamento (53 °C) nas reações de RT-PCR, que deve ter permitido amplificação inespecífica, facilitada pelo anelamento em pequenos trechos coincidentes com o gene da capa protéica de *Allexivirus*. A presença de CMV também foi confirmada por meio de teste sorológico via Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Pelo levantamento feito na literatura neste momento, não foi verificado outro relato de CMV em alho-poró no mundo.

Palavras-chave: *Allium*, Aliáceas, Vírus, Sorologia

GENERAL ABSTRACT

The culture of leek (*Allium ampeloprasum* var. *Porrum* L.) excels in the culinary world for its distinctive flavor when compared to other aliáceas. It is well known in other countries culinary like China, Japan and Brazil. The *Allium* genus has as its representatives, cultivated and decorative vegetables of economic importance such as garlic (*A. sativum* L.), onion (*A. fistulosum* L.) and leek, which, among the other aliáceas, is the least utilized in the national market, although demand by Brazilian cuisine is growing. The plant is phenotypically similar to garlic, being, however, more vigorous and having a simple bulb, which differs them. Its propagation happens through seeds and bulbs, the latter making possible an efficient dissemination of pathogens, especially viruses. Viral infections currently are the main cause of infection in the culture, possibly causing great reduction of production. This task consisted of an investigation of viral infections in leek production fields in Pernambuco's barren region, based on serological and molecular analysis. Leek plants showing virus symptoms and damage by mite were collected in Vitória de Santo Antão (Pernambuco), in the Natuba community, where the RNA_{total} was extracted for subsequent cDNA synthesis for use in RT-PCR reactions. The primers used in the reaction were designed from sequences of coat protein from *Allexivirus* deposited in the Gen-bank. The amplified fragments referent to the five samples were purified, cloned and sequenced afterwards. After analysis of the sequences in BLAST (www.ncbi.nih.nlm.gov) it was ascertained that the samples from the five Brazilian isolated showed no similarities to the sequences of genus *Allexivirus*, however, they showed 100% homology with a portion of RNA1 of *Cucumber mosaic virus* (CMV). Such results can be justified from the reduction of the annealing temperature (53° C) in RT-PCR reactions, which should have allowed nonspecific amplification, facilitated by the annealing in small snippets coinciding with the coat protein gene of *Allexivirus*. The presence of CMV was also confirmed by serological test via Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Key-words: *Allium*, Aliáceas, viruses, serology

CAPÍTULO I

Introdução Geral

DETECÇÃO SOROLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *CUCUMBER MOSAIC VIRUS* EM ALHO-PORÓ NA REGIÃO AGRESTE DE PERNAMBUCO

INTRODUÇÃO

1. A cultura do alho-poró

O alho-poró (*Allium ampeloprasum* var. *porrum* L.) é uma hortaliça condimentar consumida mundialmente, há milhares de anos, pelos antigos gregos e romanos. A origem da espécie é controversa, mas a maioria dos relatos reporta como sendo originária da Ásia Central. Atualmente a hortaliça é cultivada praticamente em todo o mundo. No Brasil, a produção está concentrada nos estados do Sul e do Sudeste embora alguma produção seja encontrada no estado de Pernambuco.

Trata-se de uma planta monocotiledônea que pertence à família *Alliaceae*, a qual abriga uma ampla gama de espécies perfazendo um total de aproximadamente 750 (BOITEUX; MELO, 2004). É uma planta perene e bulbosa e um dos vegetais que vem se difundindo na culinária brasileira, por apresentar consideráveis teores de vitaminas A, B e C (LANA; LOBO, 2013).

O alho-poró é semelhante ao alho comum, porém é maior e com folhas mais largas, alongadas e verde-escuras e seu sabor é mais suave comparado ao da cebola (*A. cepa* L.) (CEASA, 2011). Esta planta é usada não só como alimento, mas também como planta medicinal. Os bulbos são usados na medicina tradicional brasileira para tratar sintomas inflamatórios. O alho-poró esmagado é utilizado para tratar estágios iniciais de tosse, secreção de muco e dor de garganta (ADÃO; SILVA; PARENTE, 2011).

O bulbo do alho-poró apresenta de 3-10% de inulida e de 2-5% de oligossacarídeos, que podem ser considerados fibras dietéticas visto que não são digeridos pelo organismo, tem valor calórico zero e podem ser utilizados por diabéticos (VAN LOO et al., 1995). A ingestão desses componentes melhora o metabolismo lipídico, as funções intestinais, modulam a flora microbiana, suprime e previne doenças intestinais crônicas, previne o câncer, melhora o sistema imunológico, a absorção de minerais, e ainda, a performance mental e o sentimento de bem estar (VAN LOO et al., 1995). Os membros da família *Alliaceae* estão entre os vegetais que mais armazenam inulina e saponina sendo, portanto, uma fonte promissora dessas duas substâncias no segmento industrial (ADÃO; SILVA; PARENTE, 2011).

O alho-poró está entre as 50 hortaliças mais vendidas no país segundo a CONAB (2012). O manejo dessa cultura é uma atividade artesanal com alto valor social, por ser praticada em pequenas áreas por agricultores de base familiar. O cultivo em grande escala exige grande quantidade de mão de obra, cerca de 240 homem/dia/ha, durante o período de cultivo. É uma planta típica de frio e devendo ser plantada nos períodos de outono e inverno (CONAB, 2012).

No Brasil, as espécies comerciais de alho são cultivadas em campo, no entanto, as mudas e os progenitores utilizados em cruzamentos controlados são livres de vírus e geralmente cultivadas em estufa ou em condições de casa de vegetação (REIS et al., 2004).

Sementes de alho-poró são melhores conservadas em condicionamento osmótico, pois apresentam melhor emergência, uniformidade e velocidade de germinação das plântulas em solos com alta concentração salina, além de minimizar o efeito de microrganismos causadores de tombamento *damping-off* (NASCIMENTO, 2004).

2. Doenças de plantas pertencentes ao gênero *Allium*

As espécies do gênero *Allium* prevalecem localizadas em lugares de latitudes e altitudes diferentes que vão desde o continente europeu até o Círculo Polar Ártico, Ásia, América do Norte e África. Doenças de natureza fúngica provocam grandes prejuízos por danificarem tanto aos bulbos quanto as folhas da planta. Em alho-poró destacam-se a mancha púrpura, provocada por *Alternaria porri* (Ellis), a podridão branca causada por *Sclerotium cepivorum* (Berk) e podridões causadas por *Fusarium* spp. (BOITEUX; MELO, 2004).

Um número considerável de doenças foliares provocadas por fungos são relatados em espécies de *Allium* como *Phytophthora porri* (Foister) (DECLERCQ et al., 2010), *Alternaria* (*A. porri*), *Stemphylium* spp. (RAO; PAVGI, 1975; SHISHKOFF; LORBEER, 1989; BOITEUX et al., 1994; MILLER, 1995), Míldio (*Peronospora destructor Casp* (Berk.)) (MAFFIA; MIZUBUTI; PEDROSA, 2002; ZAMBOLIM; VALE; COSTA, 2000) e Oídio (REIS et al., 2004).

Os sintomas causados por fungos são muito variáveis, indo desde o crestamento, podridão do caule e dos bulbos e subdesenvolvimento das plantas, até o amarelecimento e morte das folhas mais velhas.

Bactérias também são descritas como causadoras de importantes doenças nesse gênero, como por exemplo, *Pseudomonas syringae* pv. *porri*, agente causal do crestamento

bacteriano do alho-poró, que é uma ameaça para a produção desta hortaliça na Holanda, (OVERBEEKA et al., 2010)

Apesar dos danos causados por fungos e bactérias serem grandes, as viroses ainda são um dos maiores problemas do gênero. São difíceis de serem evitadas devido ao seu processo de transmissão. A família *Alliaceae*, em particular, é atacada por viroses em diversas partes do mundo, causando perdas significativas de produção. Os principais gêneros atacados são *Allium sativum* L. var. *sativum* (alho), *A. cepa* L. (cebola), *A. ampeloprasum* var. *porrum* (alho-poró) (Katis; Maliogka; Dovas, 2012).

As espécies desse gênero apresentam um número de fitovírus estimado em mais de 100, sendo que em vários trabalhos realizados no Brasil e no mundo comprovam que todo cultivo de alho apresenta pelo menos dois vírus (CONCI et al., 2000). Entre os vírus de maior ocorrência destacam-se várias espécies pertencentes aos gêneros *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus* (CONCI et al., 2003).

Em condições naturais, a transmissão de vírus em aliáceas ocorre por vetores ou via bulbos ou bulbilhos contaminados (COSTA, 1999). Os principais vetores de vírus dessa cultura são os afídeos e ácaros. Todos os vírus que são patogênicos a alguma espécie de *Allium* provocam perda progressiva da produção ao longo de várias gerações de cultivo, em condições de campo (MELO FILHO, 2003).

Em alho comum, bulbilhos contaminados são comumente usados em países como a Holanda, EUA, França, Uruguai, Argentina, China, assim como no Brasil. Pesquisas para a obtenção de bulbilhos sadios de alho comum visando elevar a produtividade são frequentes, principalmente nos países de maior produção. Em alho-poró os vírus chegam através de ácaros e afídeos e podem causar perdas significativas na produção, além de redução na qualidade do produto, refletindo no mercado consumidor cada vez mais rigoroso com a qualidade do produto (SHAHRAEEN; LESEMANN; GHOTBI, 2008).

O manejo para uma produção de alho-poró livre de vírus é de grande importância econômica. O método mais comum para a obtenção de plantas livre de vírus é por meio do cultivo in vitro, associada à termoterapia (WALKEY et al., 1987; CONCI; NOME, 1991; VERBEEK et al., 1995)

As viroses do gênero *Allium* podem ter pelo menos cinco vírus de diferentes famílias, por meio de infecção única e /ou mista, segundo Van Dijk (1993b).

Os principais vírus associados ao gênero *Allium* são: *Leek yellow stripe virus* (LYSV) (BOS, 1981), amplamente distribuído na Europa; *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) ambos pertencentes ao gênero *Potyvirus*, *IYSV* (*Iris yellow spot virus*) do gênero *Tospovirus*

(GAMAGE; MEHRABAN; PETERS, 2010); *Galic common latent virus* (GarCLV) do gênero *Carlavirus*, *Shallot latent virus* (SLV) (VAN DIJK, 1993a); *Garlic latent virus* (GarLV). Um total de oito espécies de allexivírus são associadas ao alho e são aceitas pelo ICTV, tais como: *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B), *Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D) (SUMI et al., 1993), *Garlic virus E* (GarV-E) (JIONG; JIANPING, 2002), *Garlic virus X* (GarV-X), *Shallot virus X* (SVX) (VAN REGENMORTEL et al., 2000) e *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV). No Brasil foram detectadas quatro espécies, sendo elas: GarV-A, GarV-C, GarV-D e GarMbFV (MELO FILHO, 2003). Os ácaros são os vetores das espécies do gênero *Allexivirus*, tendo como hospedeiras somente espécies pertencentes ao gênero *Allium*, podendo ser isolados com uso das plantas como *Chenopodium murale* L. e *Chenopodium quinoa* W. (MOURA, et al., 2013).

A família *Potyviridae*, abriga o maior e mais importante grupo de vírus de plantas (ZERBINI et al., 2001). Os gêneros pertencente a essa família apresenta partícula filamentosa e flexuosa, com RNA de fita simples envolto por uma capa protéica composta por subunidades de uma proteína com peso molecular variando de 30 a 37 kDa (MARTELLI, 1997), e genoma de 8 a 12 kb. A transmissão por insetos é através de afídeos em uma relação do tipo persistente. (AGRIOS, 2005).

A família carlavirus são também flexuosos e filamentosos e compostos por RNA de fita simples e envoltos por uma capa protéica composta de subunidades com peso molecular variando de 31 a 36 kDa (MARTELLI, 1997). Todos apresentam cauda de poli A na região 3'. A transmissão se dá por afídeos de forma não persistente e alguns por sementes (VAN REGENMORTEL et al., 2000).

Os Allexivírus têm uma organização do genoma semelhante aos Carlavirus, possui um genoma de RNA senso positivo. A primeira espécie do gênero *Allexivirus*, denominada *Shallot virus X* (ShV-X), foi relatada na década de 70 e o termo allexivirus originou-se das iniciais do nome científico do hospedeiro, *Allium* (MELO FILHO, 2004).

O RNA genômico dos allexivírus é formado por seis fases abertas de leitura (*Open Reading Frame* - ORF) e um genoma poliadenilado que codifica uma alpha replicase (170-195 kDa em allexivíroses) e 5 ORFs menores. A ORF2 codifica uma proteína de 25-28 kDa (TGBp1), e a ORF3 é responsável pela codificação de uma proteína de 11-12 kDa, a qual forma o TGBp2 (CHEN et al., 2001). A ORF5 codifica para proteína da capa protéica (CP); trata-se de uma região bem conservada em todas as espécies do gênero (CHEN et al., 2001) que apresenta um peso molecular entre 26-29 kDa. A ORF 6 codifica para uma proteína rica em leucina e apresenta um peso de 14-15 kDa, a ORF4 apresenta um código para a síntese de

uma proteína de 32-43 kDa, cuja função ainda não é definida, mas sabe-se que é rica em serina.

Os pioneiros na caracterização molecular desse grupo de vírus foram Sumi e Yamashita (SUMI et al., 1993; YAMASHITA et al., 1996). Eles produziram anti-soros monoclonais específicos para algumas espécies de Allexivírus. As doenças decorrentes dos vírus desse gênero afetam expressivamente a produção de alho quando atuam em combinações com potyvirose e há uma dificuldade de isolar cada espécie do complexo viral (NASCIMENTO, 2006).

Atualmente a detecção de vírus em bulbos pode ser realizada por testes sorológicos e/ou moleculares, sendo que na primeira a planta infectada deve apresentar uma alta concentração de partículas virais. Trabalho desenvolvido por Nascimento (2006) há o relato sobre metodologia capaz de fornecer material para análise molecular diretamente do bulbilho.

No Sudoeste da Alemanha, as espécies do gênero *Allium* são muito importantes com 2.400 ha plantados, sendo 1.300 ha com diferentes tipos de cebolas e 800 ha com alho-poró, representando 34% da produção no país, nessa região as doenças causadas por vírus provocam grandes perdas na produção (KRAUTHAUSEN et al., 2012).

A espécie *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), do gênero *Potyviridae*, provoca redução de até 60% na produção de alho (BOS, 1981) e demonstra maior especificidade com esse hospedeiro, do que com alho-poró. De acordo com Lot et al. (1998), a infecção de outros hospedeiros, como meio para purificação deste vírus não é bem sucedida, como também ocorre com *Leek yellow stripe virus* (LYSV) de alho-poró e OYDV de cebola. Em função disso, há necessidade de se estudar outros modos de identificação de vírus e purificação de plantas de modo a auxiliar nas análises individuais dos hospedeiros.

Alguns vírus têm sido comumente encontrados em alho-poró, sendo um deles o IYSV (*Iris yellow spot virus*), um Tospovírus da família *Bunyaviridae*, que tem sido relatado em uma série de países como a Holanda, Alemanha, Reino Unido, Brasil e Austrália (SCHWARTZ; OTTO, 2007)

O vírus LYSV descrito comumente em alho-poró (*A. ampeloprasum* var. *porrum*) teve incidência diminuída na Holanda desde 1970, ao contrário dos países vizinhos que começaram a ser gravemente afetados (GRAICHEN et al., 1987). Aparentemente isso ocorreu na Holanda devido à resistência de novas cultivares implantadas. A ocorrência separada desse potyvírus em plantas cultivadas através de sementes de alho-poró, tem facilitado o seu isolamento e caracterização. Em plantas do gênero *Allium*, o LYSV foi um dos primeiros

caracterizados e teve anti-soros produzidos. Ainda na Holanda, Van Dijk (1993b) detectou o vírus *Garlic common latent virus* (GCLV), infectando plantas de alho-poró.

Na Dinamarca Paludan (1980) identificou o SLV, uma espécie de Carlavirus em uma infecção mista com LYSV, cuja interação fez agravar os sintomas em alho-poró.

Um vírus até então não encontrado em alho-poró é o *Cucumber mosaic virus* (CMV) pertence ao gênero *Cucumovirus* da família *Bromoviridae*. Foi relatado pela primeira vez em 1916 como o agente causal de uma doença de pepino e melão em Michigan e de pepino em Nova York. Desde então, o CMV tem sido encontrado na maioria dos países do mundo, principalmente nas zonas temperadas, e atualmente com mais frequência nos países tropicais (PALUKAITIS et al., 1992). Trata-se de um dos vírus que possui uma das maiores gamas de hospedeiros. O número de espécies de plantas identificadas como hospedeiras do CMV tem aumentado ao longo dos últimos 60 anos, infectando culturas alimentares, plantas ornamentais e daninhas, cobrindo mais de 1.300 espécies de vegetais em cerca de 40 famílias botânicas (PALUKAITIS et al., 1992).

Esse vírus é transmitido principalmente por afídeos de forma não-persistente, cujo inseto transmite mais de 80 tipos de patógenos virais. O CMV é transmitido por mais de 80 espécies de afídeos, sendo os mais importantes: *Aphis gossypii* e *Myzus persicae* (GARCÍA ARENAL; PALUKAITIS, 2008). A transmissão de forma não-persistente faz com que o vírus seja facilmente difundido através da seiva da planta. A transmissão se dá também por sementes, plantas parasitas, pelo homem e inoculação mecânica, mas essas formas geralmente possuem baixa taxa de incidência e eficiência (KHAN; MAHMOOD; SHAFQUE, 2011).

Trata-se de um vírus de RNA de fita simples senso positivo, dividido em três partes: RNA 1, 2 e 3 em ordem decrescente de peso molecular (SUEDA et al., 2010) que codificam cinco proteínas, designadas 1a, 2a, 2b, 3a e 3b. O RNA 1 e o RNA 2 codificam respectivamente as proteínas 1a e 2a, ambas envolvidas na replicação (HAYES; BUCK, 1990).

Esse Cucumovírus possui RNA subgenômico, o RNA4A, é gerado a partir da extremidade 3' do RNA2, que desempenha vários papéis na indução de sintomas, gama de hospedeiros, movimentos sistêmicos e de célula-a-célula (SHI et al., 2003), além de funcionar como um supressor do silenciamento de RNA, um mecanismo de defesa do hospedeiro contra infecções virais (DING; LI; SYMONS, 1995). O RNA 3 é bicistrônico, ou seja codifica duas proteínas, a 3a envolvida no movimento do vírus, e a 3b que está envolvida na formação da capa protéica (PALUKAITIS; GARCIA-ARENAL, 2003). Essa dá origem ao RNA4 (subgenômico) que codifica a proteína que forma a capa protéica. O RNA 2 também codifica a proteína 2b, através do seu RNA4A subgenômico (DING et al., 1995). A ORF 2b sobrepõe

uma parte da ORF 2a na extremidade 3' (DING; LI; SYMONS, 1995). A encapsidação separada dos RNAs formam três partículas virais que são necessários para infecção sistêmica (PALUKAITIS et al., 1992).

Com base nas sequências de RNA o CMV é ainda classificado em três subgrupos, IA, IB e II (ROOSSINCK; ZHANG; HELLWALD, 1999).

O CMV está entre o grupo de vírus não-envelopados sendo um vírion esférico, com aproximadamente 29 nm de diâmetro, 12 pentâmeros e 20 hexâmeros (Viral zone, 2014).

A replicação acontece no citoplasma: o vírus entra na célula do hospedeiro, em seguida acontece a desencapsidação e a liberação do RNA genômico viral no citoplasma. As proteínas 1a e 2a são expressas para a produção das proteínas de replicação. A fita dupla de RNA (dsRNA) é sintetizado a partir do RNA genômico. O RNA de fita dupla é transcrito/replicado formando o novo ssRNA (+) genômico. O RNA4 subgenômico é traduzido e produz proteínas capsidiais e assim há a montagem de novas partículas virais. A proteína viral responsável pelo movimento do vírus na planta provoca a formação de estruturas tubulares que medeiam a transferência do virion de célula-a-célula através do aumento do limite de exclusão do plasmodesma e assim transportando ativamente o ácido nucléico viral, acontecendo assim a transmissão local e/ou sistêmica do vírus nas plantas (Viral Zone, 2014).

O CMV possui uma ampla gama de hospedeiros por isso comumente é descrito como causador de doenças em várias espécies de plantas, devido a grande adaptabilidade com cultivares das hospedeiras e por se adaptar em condições ambientais variadas, torna-se um problema o controle da propagação do vírus em cultivos comerciais (GOUGH; COCKBURN; WHITELAM, 1999).

As estratégias de controle incluem propagação de plantas livres de vírus, erradicação de plantas infectadas, cultura de meristemas, uso de plantas hospedeiras alternativas e controle do vetor (PALUKAITIS et al., 1992; LUNELLO; DUCASSE; CONCI, 2005). No entanto, estes métodos tradicionais de controle não são tão eficazes como para outros vírus transmitidos por afídeos (TOMLINSON, 1987). Uma série de estratégias como o melhoramento genético, com uso de plantas tolerantes e resistentes tem sido utilizadas para tentar minimizar os efeitos do CMV em plantas suscetíveis (CARANTA et al., 1997).

No Brasil, pouco se sabe sobre viroses na cultura do alho-poró porque os métodos tradicionais de detecção baseados na gama de hospedeiros, sintomatologia e sorologia tem capacidade limitada para diferenciar os vírus (LUNELLO; DUCASSE; CONCI, 2005). Ademais, poucos relatos de doenças têm sido descritos nessa cultura no país. Em se tratando

de sorologia, há dificuldades para a produção de anti-soros de qualidade, devido à baixa concentração do patógeno no hospedeiro e ainda a possibilidade das viroses que atacam gênero *Allium* infectarem de forma mista, interferindo na produção de anti-soros específicos para a identificação dos vírus (VIEIRA, 2012).

Atualmente as ferramentas da biologia molecular têm proporcionado novas oportunidades para identificação e classificação de vírus, além auxiliar nas inter-relações entre gêneros, espécies e subespécies de vírus distintos. Com base na biologia molecular, um grande número de espécies virais tem sido descritas em diferentes gêneros. Particularmente para CMV é encontrado na literatura informações acerca de sua configuração genética, o que permite sua detecção e identificação de maneira mais precisa e confiável.

Como ocorre na maioria das culturas, com o aumento do consumo há progressivamente o aumento da produção, o que acarreta o estabelecimento de pragas e doenças que podem causar danos econômicos e até sociais. Em Natuba, distrito localizado no município de Vitória de Santo Antão (Latitude: -8.11389, Longitude: -35.2915), na região Agreste de Pernambuco, as áreas plantadas com alho-poró, mostram uma redução na produção de bulbos e folhas, devido a doenças provavelmente causadas pela presença de vírus e ácaros. Com objetivo de elucidar o agente etiológico envolvido nesse patossistema, desenvolveu-se o presente estudo que contou com testes moleculares e sorológicos, de modo a testar as espécies associadas aos sintomas observados nas plantas de alho-poró. Como benefícios à cultura, tais informações permitirão a elaboração de estratégias de manejo para permitir o controle e manter a atividade da cultura na região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÃO, C. R.; SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. A new steroidal saponin with antiinflammatory and antiulcerogenic properties from the bulbs of *Allium ampeloprasum* var. *porrum*. **Fitoterapia**, v.82, p.1175-1180, 2011.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed.: Elsevier, 2005. 922 p.

BOITEUX, L. S.; MELO, P. C. T. **Taxonomia e origem. In: EMBRAPA HORTALIÇAS. Sistema de produção de cebola (*Allium cepa* L.)**. Brasília, 2004. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_cebola/taxonomia_e_origem.htm>. Acesso em: 25 nov. 2013.

BOITEUX, L. S.; LIMA, M. F.; MENEZES SOBRINHO, J. A.; LOPES, C. A. A garlic (*Allium sativum*) leaf blight caused by *Stemphyllium vesicarium* in Brazil. **Plant Pathology**, v.43, p. 412-414, 1994.

BOS, L. *Leek yellow stripe virus*. **Descriptions of plant viruses**, CMI/AAB, 1981. 240p.

CARANTA, C.; PALLOIX, A.; LEFEBVRE, V.; DAUBEZE, A. M. QTLs for a component of partial resistance to *cucumber mosaic virus* in pepper: Restriction of virus installation in host-cells. **Theoretical and Applied Genetics**. v.94, p. 431–438, 1997.

CEASA. Centro Estadual de Abastecimento. **Pesquisa sobre o consumo de frutas e hortaliças_CNA - Análise quantitativa: CEASA**, 2011. Disponível em:<<http://www.ceasa.gov.br/dados/publicacao/Pesquisa%20qualitativa.pdf>>. Acesso em: 10 Jan. 2014.

CHEN, J.; ZHENG, H. Y.; ANTONIW, J. F.; ADAMS, M. J.; CHEN, J. P.; LIN, L. Detection and classification of allexviruses from garlic in China. **Archives of Virology**, v.149, n. 3, p. 435-445, 2001.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Indicadores da Agropecuária. Brasília: CONAB**, 2012. Disponível

em:<<http://www.conab.gov.br/conab/Main.php?MagID=3&MagNo=142> >. Acesso em: 6 Jun. 2012.

CONCI, V. C.; BRACAMONTE R.; ALOCHE, P.; BURASHI, D.; LUNELLO, P.; CAFRUNE, E. Producción de plantas de ajo libre de lós vírus transmitidos por pulgones y ácaros. **Horticultura Argentina**. v.19, n.46, p.60, 2000.

CONCI, V. C.; CANAVELLI, A.; LUNELLO, P. Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. **Plant Disease**, v.87, p.1411-1415, 2003.

CONCI, V. C.; NOME S. F. Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tipculture. **Journal of Phytopathology**, v.132, p.186–192, 1991.

COSTA, C. L. **Vetores de vírus de plantas. II – Fungos, Nematóides e Ácaros**. In: LUZ, W. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: p.213-258, 1999.

DECLERCQ, B ; VAN BUYTEN, E ; CLAEYS, S ; CAP, N ; DE NIES, J ; POLLET, S ; HOFTE, M. Molecular characterization of *Phytophthora porri* and closely related species and their pathogenicity on leek (*Allium porrum*). **European Journal of Plant Pathology**, v.127, p.341-350, 2010.

DING, S.; LI, W.; SYMONS, R.H. A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. **EMBO Journal**. v.14, p.5762–5772, 1995.

GAMAGE, S. M. K. W; MEHRABAN A. H; PETERS D. Identification of *Iris yellow spot virus* on leek (*Allium porrum*) in Sri Lanka. **Plant Disease**, v 94, p.1070-1070, 2010.

GARCÍA, A. F.; PALUKAITIS, P. *Cucumber Mosaic Virus*. In: **Encyclopedia of Virology** (Third Edition), 2008, p.614-619.

GOUGH, K. C.; COCKBURN, W.; WHITELAM, G. C. Selection of phage-display peptides that bind to *Cucumber mosaic virus* coat protein. **Journal Virol Methods**. v.79, p. 169-80, 1999.

GRAICHEN, K., PROLL, E., RICHTER, J.; LEISTNER, H. U. Reinigung und serologischer Nachweis des Porreegelbstreifen-Virus (*leek yellow stripe virus*). **Archives Of Phytopathology And Plant Protection**. v.23, n. 6, p 501-504, 1987.

HAYES, R.J.; BUCK, K.W. Complete replication of a eukaryotic virus RNA *in vitro* by a purified RNA-dependant RNA polymerase. **Cell**. v.63, n. 4, p. 363–368, 1990.

JIONG, C.; JIANPING, C. Genome organization and phylogenetic tree analysis of *Garlic virus E*, a new member of genus *Allexivirus*. **Chinese Science Bulletin**. v.47, n. 1, p. 33-37, 2002.

KATIS, N. I.; MALIOGKA V. I.; DOVAS C. I. Viruses of the genus *Allium* in the Mediterranean region. **Advances in Virus Research**. v.84, p. 163–208, 2012.

KHAN, M. A.; MAHMOOD, Y.; SHAFQUE, M. Effectiveness of plant based insecticides as a sustainable means of control of *Cucumber mosaic virus*. **African journal of food, agriculture, nutrition and development**. v.11, n. 7, p. 5475-5493, 2011.

KRAUTHAUSEN, H. J.; LEINHOS, G. M. E.; MULLER, J.; RADTKE, P. C.; JEHLE, J. A. Identification and incidence of *Iris yellow spot virus* in allium field crops in southwest germany. **European Journal of Plant Pathology**, v.134, n. 2, p.345-356, 2012.

LANA, M.M.; LOBO, L. **Alho-Porró uma hortaliça codimentar**. Brasil, 2013. Disponível em:<http://www.cnph.embrapa.br/hortalicasnaweb/alho_porro.html>. Acesso em: 25 nov. 2013.

LOT, H.; CHOVELON, V.; SOUCHE, S.; DELECOLLE, B. Effects of *Onion yellow dwarf* and *Leek yellow stripe viruses* on symptomatology and yield loss three French garlic cultivars. **Plant Disease**, v.82, p. 1381-1385, 1998.

LUNELLO, P.; DUCASSE, D.; CONCI, V. Improved PCR detection of potyviruses in *Allium* species. **European Journal of Plant Pathology**, v. 112, n. 4, p. 371-378. 2005.

MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; PEDROSA, R.A. Doenças da cebola. **Informe Agropecuário**, v.23, n.218, p.75-87, 2002.

MARTELLI, G.P. Plant virus taxa: Properties and epidemiological characteristics. **Journal of Plant Pathology**, v.79, p. 151-171, 1997.

MELO FILHO, P.A. **Deteccão e caracterização molecular de *Allexivirus* e estudo de degenerescência em plantas de alho (*Allium sativum* L.) provocada por vírus**. 2003, 116 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília. 2003.

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**, v. 39, n. 8, p. 735-740, 2004.

MILLER, M. E. *Stemphylium* leaf blight and stalk rot. In: SCHWARTZ, H. F.; MOHAN, S. K. (Ed.). **Compendium of onion and garlic diseases**. St. Paul: APS Press, 1995. p. 25-26.

MOURA, A. P.; GUIMARÃES, J. A.; FERNANDES, F. R.; MICHEREFF FILHO, M. **Recomendações técnicas para o manejo integrado de pragas da cultura do alho**. Brasília: Embrapa hortaliças, 2013. 12p. (Comunicado técnico 118).

NASCIMENTO, R. J. **Análise molecular em alho consumo nacional e importado para deteção da presença de allexivírus**. 2006, 51f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

NASCIMENTO, W. M. **Condicionamento Osmótico de Sementes de Hortaliças**. Brasília: Embrapa hortaliças, 2004. 2p. (Comunicado técnico, 33).

OVERBEEKA, L. S. V.; NIJHUISA, E. H. M.; KOENRAADTB, H.; VISSERC, J.; KRUISTUMC, G. V. The role of crop waste and soil in *Pseudomonas syringae* pathovar *porri* infection of leek (*Allium porrum*). **Applied soil ecology**, v.46, n.3, p. 457-463, 2010.

PALUDAN, N. Virus attack on leek: Survey, diagnosis, tolerance of varieties and winter hardiness. **Tidsskrift for Planteavl**, p.371-385, 1980.

PALUKAITIS, P.; GARCIA ARENAL F. Cucumoviruses, **Advances in Virus Research**, v.62, p. 241-323, 2003.

PALUKAITIS, P.; ROOSSINCK, M.J.; DIETZGEN, R.G.; FRANCKI, R.I.B. *Cucumber Mosaic Virus*. **Advances in Virus Research**, v.41, p. 281–348, 1992.

RAO, N. N. R.; PAVGI, M. S. *Stemphylium* leaf blight of onion. **Mycopathologia**, v. 56, p. 113-118, 1975.

REIS, A.; BOITEUX, L. S.; PAZ LIMA, M.L.; SILVA, P.P.; LOPES C.A. Powdery mildew of *Allium* species caused by *Oidiopsis taurica* in Brazil. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.4, p. 758-760, 2004.

ROOSSINCK, M. J., ZHANG, L.; HELLWALD, K.H. Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of *Cucumber mosaic virus* RNA3 indicate radial evolution of three subgroups. **Journal of Virology**. v.73, p. 6752–6758, 1999.

SHAHRAEEN, N.; LESEMANN, D. E.; GHOTBI, T. Survey for viruses infecting onion, garlic and leek crops in Iran. v. 38, p. 131–135, 2008.

SCHWARTZ, H. F.; OTTO, K. First Report of Iris yellow spot virus in Commercial Leek (*Allium porrum*) in the United States. **Plant Disease**, v.91, n.10, p. 1365, 2007.

SHI, B. J.; MILLER, J.; SYMONS, R. H; PALUKAITIS, P. The 2b Protein of Cucumoviruses Has a Role in Promoting the Cell-to-cell Movement of Pseudorecombinant Viruses. **Molecular Plant-microbe Interactions**, v.16, n. 3, p.261-267, 2003.

SHISHKOFF, N.; LORBEER, J. W. Etiology of *Stemphylium* leaf blight of onion. **Phytopathology**, v. 79, p. 301-304, 1989.

SUEDA, K.; SHIMURA, H.; MEGURO, A.; UCHIDA, T.; INABA, J.; MASUTA, C. The C-terminal residues of the 2b protein of *Cucumber mosaic virus* are important for efficient

expression in *Escherichia coli* and DNA-binding. **FEBS Letters**, v. 584, n. 5, p. 945-950, 2010.

SUMI, S. I.; TSUNEYOSHI, T.; FURUTANI, H. Novel Rod-shaped viruses isolated from garlic, *Allium sativum*, possessing a unique genome organization. **Journal of General Virology**. v. 74, p. 1879-1885, 1993.

TOMLINSON, J. A.; Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. **Annals of Applied Biology**, v.110, p. 661–681,1987.

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

VAN DIJK, P. Survey and characterization of potyviruses and their strains of *Allium* species. **Netherlands Journal of Plant Pathology**. v. 99, n. 2, p. 1-48, 1993b.

VAN LOO, J.; COUSSEMENT, P.; DE LEENHEER, L.; HOEBREGS, H.; SMITS, G. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 6, p. 525-552, 1995.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMOS, S. M.; MANILLOF, J.; MAYO, M. A.; McGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. **Virus Taxonomy** : Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Academic Press: New York, 2000. 1121p.

VERBEEK, M.; VAN DIJK P.; VAN WELL M. A. Efficiency of eradication of four viruses from garlic (*Allium sativum*) by meristem-tip culture. **European Journal of Plant Pathology** v.101, p.231–239, 1995.

VIEIRA, R. L. **Aspectos fisiológicos e fitossanitários na micropropagação para a obtenção de alho semente livre de vírus**. 2012, 193f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

VIRAL ZONE. Disponível em:
<http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/135.html>. Acesso em: 08/08/2014.

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.

YAMASHITA, K.; SAKAI, J.; HANADA, K. Characterization of a new vírus from Garlic (*Allium sativum* L.), *Garlic mite-Borne mosaic virus*. **Annual Phytopathology Society Japan**. v.62, p. 183-189, 1996.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. **Controle de Doenças de Plantas: Hortaliças**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000, 879 p.

ZERBINI, F. M.; AMBROZEVÍCIUS, L.P.; IOUE-NAGATA, A.K. Diagnose molecular de fitoviroses. Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia. **Sociedade Brasileira de Fitopatologia**. p. 95-124, 2001.

CAPÍTULO II

Detecção de *Cucumber mosaic virus* em alho-poró na região agreste de Pernambuco, Brasil

1 **Detecção de *Cucumber mosaic virus* em alho-poró na região agreste de Pernambuco,**

2 **Brasil**

3 **Detection of *Cucumber mosaic virus* in leeks in the rugged region of Pernambuco, Brazil**

4 Jackeline Figueira da Silva¹, Roseane Cavalcanti dos Santos², Liziane Maria Lima², Genira

5 Pereira de Andrade¹, Péricles de Albuquerque Melo Filho¹

6 ¹*Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900*

7 *Recife-PE-Brasil. E-mail: Jackeline.figueira@hotmail.com; genira@depa.ufrpe.br;*

8 *pericles@depa.ufrpe.br*

9 ²*Embrapa Algodão. E-mail: roseane.santos@cnpa.embrapa.br; liziane.lima@embrapa.br*

10

11 **RESUMO**

12

13 O alho-poró (*Allium ampeloprasum* var. *porrum* L.) é uma hortaliça condimentar cultivada

14 por pequenos produtores de base familiar. O manejo dessa cultura é tipicamente manual e os

15 principais problemas residem na ocorrência de doenças provocadas por vírus que afetam

16 expressivamente a produção. Em Pernambuco, na comunidade de Natuba, localizada na

17 região Agreste foi verificada a presença de sintomas de vírus nas áreas de cultivo com alho-

18 poró. Com o objetivo de identificar o agente causal, realizou-se o presente trabalho, com

19 utilização de técnicas sorológicas e moleculares. Amostras de plantas com sintomas de

20 viroses foram coletadas e mantidas em casa de vegetação para posteriores análises. Nos testes

21 moleculares, considerando-se a frequente ocorrência de danos provocados por ácaros, foram

22 empregados primers específicos capazes de amplificar o gene da capa protéica de espécies de

23 *Allexivirus*. Os fragmentos obtidos foram purificados e sequenciados, cuja análise revelou a

24 presença de *Cucumber mosaic virus* (CMV), com 100% de identidade em grande parte do

25 fragmento obtido. A confirmação de CMV também foi constatada no teste de ELISA,

26 utilizando anti-soro específico. A detecção do CMV por meio de primers não específicos é

27 justificada pela flexibilização nas temperaturas de anelamento empregadas e ainda pela
28 coincidência de 50% da constituição nucleotídica de cada um dos primers específicos serem
29 capazes de anelar no gene da capa protéica do CMV. Até o momento e com base na revisão
30 bibliográfica realizada, este é o primeiro registro de CMV em áreas de produção de alho-poró
31 no mundo.

32

33 **Palavras-chave:** *Allium*, Aliáceas, *Cucumber mosaic virus*. Sorologia.

34

35 **ABSTRACT**

36 Leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum* L.) is a seasoning vegetable cultivated by small
37 producers. This culture's management is typically manual and the main problems reside in the
38 occurrence of diseases transmitted by insects, which significantly affects production. In
39 Pernambuco, established communities in Natuba, located in the western region, it's usual to
40 find various virus symptoms in cultivation areas. To identify the causative agent, we carried
41 out the present study, focusing on serological and molecular tests. Samples of plants showing
42 symptoms of virus infection were collected and maintained in a greenhouse for subsequent
43 molecular and serological analysis. In molecular tests, considering the frequent occurrence
44 of virus in species of the genus *Allium*, specific primers were used in amplification
45 reactions. The fragments were purified and sequenced, their analysis showed the presence of
46 *Cucumber mosaic virus* (CMV), with 100% identity. The confirmation of CMV was also
47 detected in ELISA tests using specific CMV antiserum. The CMV detection by nonspecific
48 primers is justified by the flexibility on the annealing temperatures and also by the
49 coincidence of small snippets of primers with the coat protein gene of *Allium*. This is the
50 first report of CMV in leek production areas in the world.

51 **Key words:** *Allium*, Aliáceas, *Cucumber mosaic virus*. Serology.

INTRODUÇÃO

52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75

O alho-poró (*Allium ampeloprasum* var. *porrum* L.) é uma planta pertencente à família *Alliaceae*, monocotiledônea, que possui mais ou menos 750 espécies descritas e é utilizada em praticamente todos os lugares do mundo (BOITEUX; MELO, 2004).

O consumo dessa hortaliça tem crescido pelas indústrias de alimento para produção de sopas desidratadas, tempero de carnes e como planta medicinal (ADÃO; SILVA; PARENTE, 2011). No Brasil, o alho-poró é uma das 50 hortaliças mais comercializadas e a produção está concentrada nas regiões Sul e Sudeste, com áreas menores no Nordeste (CONAB, 2012). No Agreste de Pernambuco, produtores de base familiar têm investido no manejo de alho-poró para atender ao mercado regional, contudo, vem encontrando declínio na produção devido à ocorrência de sintomas nas folhas que se assemelham a viroses e danos provocados por ácaros.

As viroses são um dos maiores problemas no manejo da cultura devido ao processo de transmissão, que dificulta o controle (BOITEUX; MELO, 2004). A disseminação se dá via bulbos contaminados, além de ácaros e afídeos (MOURA, et al. 2013).

Entre os vírus de maior ocorrência em alho-poró destacam-se: *Garlic common latent virus* (GarCLV) (VAN DIJK,1993), *Shallot latent virus* (SLV), (PALUDAN, 1980), *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Leek yellow stripe virus* (LYSV), *Iris yellow spot virus*, (IYSV) (SCHWARTZ; OTTO, 2007).

No Brasil, as informações sobre viroses na cultura do alho-poró são limitadas porque os métodos tradicionais de detecção baseados na gama de hospedeiros, sintomatologia e sorologia tem capacidade limitada para diferenciar os vírus (LUNELLO; DUCASSE; CONCI, 2005). Ademais, como as viroses podem ocorrer na forma de infecção mista, a produção de anti-soros específicos para a identificação de vírus pode ficar comprometida, de

76 modo que os métodos sorológicos isoladamente podem não fornecer um diagnóstico tão
77 específico (VIEIRA, 2012).

78 Atualmente as ferramentas da biologia molecular têm sido amplamente utilizadas para
79 identificação e classificação de vírus, além de auxiliar na elucidação das inter-relações entre
80 gêneros, espécies e subespécies de vírus distintos. Com o objetivo de identificar o agente
81 causal que tem provocado sintomas de viroses nas plantas de alho-poró cultivadas em campos
82 de produção em Vitória de Santo Antão, PE, realizou-se a presente investigação através de
83 testes sorológicos e moleculares.

84

85 MATERIAL E MÉTODOS

86

87 **Prospecção de viroses em campos de produção de alho-poró**

88 Campos de produção de alho situados na região Agreste de Pernambuco foram
89 visitados. No total, três campos foram inspecionados em uma comunidade denominada de
90 Natuba, município de Vitória de Santo Antão, onde foram identificadas plantas com sintomas
91 de viroses e danos provocados por ácaros nas folhas (Figura 1).

92

93 Figura 1. Detalhe das plantas de alho-poró com sintomas de viroses (A) e danos por ácaros (B), coletadas
94 em Vitoria de Santo Antão, PE.

94

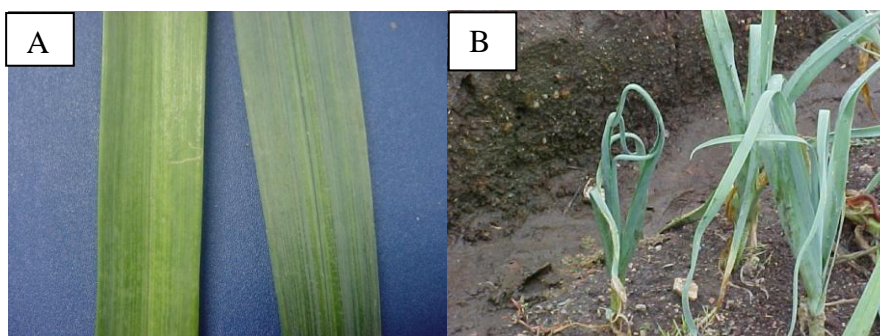
95

96

97

98

99



100 Quatorze plantas foram selecionadas e mantidas em casa de vegetação para posteriores
101 investigações moleculares e sorológicas.

102

103 **Extração do RNA e síntese de cDNA**

104 Folhas frescas (100 mg) de cada amostra foram coletadas para extração do RNA
105 utilizando-se o kit Plant RNA kit Invisorb Mini-Spin (Invitec, Alemanha), seguindo
106 recomendações do fabricante. A concentração e a pureza do RNA foram estimadas via
107 espectrofotometria (Biofotómetro Plus, Eppendorf, Alemanha) e em gel de agarose
108 desnaturante a 0,8%.

109 O cDNA foi sintetizado a 42°C, utilizando-se o Kit Super Smart PCR cDNA Synthesis
110 (Clontech, Palo Alto, EUA), com 1 µL de Oligo-dT₁₆ (20 µM), seguindo recomendações do
111 fabricante.

112 Como as plantas continham lesões feitas por ácaros, a investigação foi iniciada com
113 combinações de oligonucleotídeos de *Allexivirus*, previamente desenhados por Melo Filho et
114 al. (2004), todas capazes de anelar em regiões específicas dos genes da capa protéica de
115 *Garlic virus* A (GarV-A), *Garlic virus* B (GarV-B), *Garlic virus* C (GarV-C) e *Garlic virus* D
116 (GarV-D), além de uma combinação desenhada a partir da sequência do gene da capa protéica
117 de *Garlic virus* E (GarV-E), disponível no banco de dados GenBank do NCBI
118 (www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências dos oligonucleotídeos e os tamanhos esperados dos
119 fragmentos encontram-se na Tabela 1.

120 A reação de PCR (25 µL) teve a seguinte composição: 1 µL de cada cDNA das
121 quatorze amostras, 0,2 µL de Taq polimerase (5U/µL), 2,0 µL de DNTP (10 mM), 2,0 µL de
122 MgCl₂ (25 mM), 2,5 µL de tampão de reação (10X) e 1 µL de cada oligonucleotídeo
123 específico.

124 As reações foram conduzidas em termociclador com gradiente (Mastercycler Gradient;
125 Eppendorf), com o seguinte programa: Desnaturação inicial a 94°C/5 min, 40 ciclos de
126 desnaturação a 95°C/30 seg, anelamento variando de 45°C a 60°C/30 seg, a depender do par
127 de primer empregado na reação e extensão de 72°C/30 seg.

128

129 Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos de Alexvirus utilizados nas reações de PCR e
 130 tamanhos dos fragmentos esperados
 131

oligonucleotideo	sequência (5' - 3')	tamanho esperado (pb)
GarV-A	F: CCCAAGCTTACTGGAAGGGTGAATTAGAT R: CCCAAGCTTAGGATATTAAGTCTTGAGG	755
GarV-B	F: CCAAGCTTTTAATTTACACTGGCTTAGA R: CCAAGCTTATGCATTTCTGGGTCAAGA	731
GarV-C	F: CCCAAGCTTCATCTACAACAACAAAGGCG R: CCCAAGCTTATAAGGGTGCATGATTGTGG	779
GarV-D	F: CCAAGCTTAAGCAAGTGAAGAGTGTAAG R: CCAAGCTTTTTGGAAGAGGAGGTTGAGA	752
GarV-E	F: CGAGTTTAGCGACCAAGACT R: GATTAAAGTCGTGGGGATGC	802

132 F: Forward, R: Reverse

133

134 Um passo de extensão final a 72°C/10 min foi ainda adicionado. Os produtos da
 135 reação foram corados com Syber Blue Green (LCG), analisadas em gel de agarose a 0,8% e
 136 posteriormente purificados (Kit GFX PCR DNA Gel Band (Amersham) para clonagem em
 137 vetor bacteriano.

138

139 **Clonagem em vetor bacteriano e análise de sequenciamento**

140 Os fragmentos purificados de cada amostra foram utilizados em sistema de ligação
 141 utilizando-se o Kit pGEM-T Vector System I (Promega), de acordo com as recomendações do
 142 fabricante, e posteriormente clonados em células competentes de *Escherichia coli* - XL1-blue
 143 (Invitrogen), por meio de eletroporação (MicroPulse-Biorad), na seguinte condição: 5 µL da
 144 ligação/50 µL de solução de células eletrocompetentes foi colocado em cubeta de 0,1 cm

145 (Bio-Rad, MicroPulser) previamente resfriada e submetida a um pulso de 1,8 kV, 25 μ F e 200
146 Ω . Após o pulso, foram completados 800 μ L de meio LB (Luria-Bertaini) ao volume das
147 células, incubando-as a 37°C/1h, sob agitação (250 rpm). Os tubos (1,5 mL) com as amostras
148 foram centrifugados e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuscitado em 100 μ L
149 do mesmo meio e plaqueado em placas de Petri (12 cm) contendo LB-ampicilina (50 μ g/mL)
150 + X-gal (20 μ g/mL), 50 μ L/por placa e IPTG (100 mM), 100 μ L/placa, segundo metodologia
151 descrita em Sambrook et al. (2001). As placas foram incubadas a 37°C/12 horas.

152 A seguir, foram selecionadas 10 colônias brancas de cada placa e transferidas para tubos
153 (2,0 mL) contendo LB líquido+ampicilina (50 mg/mL), sob agitação (200 rpm) a 37°C/4hs para
154 posterior extração do DNA plasmidial (Kit GFX Micro Plasmid Prep, Amersham), seguindo
155 recomendações do fabricante. Uma alíquota de 20 μ L (20ng/ μ L) de cada amostra foi encaminhada
156 para sequenciamento, na Plataforma de Sequenciamento da Embrapa Recursos Genéticos e
157 Biotecnologia (Cenargen).

158

159 **Análise sorológica via Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)**

160 Para análise sorológica, realizada após o resultado do sequenciamento, utilizou-se o
161 teste DAS-ELISA. Folhas de plantas de alho-poró (1:20 P/V) com sintomas típicos de viroses
162 foram maceradas em tampão de cobertura e utilizadas para detecção das possíveis espécies
163 virais responsáveis pelos sintomas. Os procedimentos de detecção seguiram os seguintes
164 passos, de acordo com Almeida (2001): a) cobertura das placas com o extrato das amostras
165 (100 μ l) por 2h/37 °C, seguidas de três lavagens com Tampão de cobertura, b) cobertura da
166 placa com anti-soro (100 μ l) por 2h/37 °C, seguidas de três lavagens com o mesmo Tampão,
167 c) cobertura das placas com anti IgG de coelho (100 μ l) logo após, sendo incubadas pelo
168 mesmo período e em seguida lavadas como na primeira etapa d) cobertura das placas com
169 tampão de substrato contendo pastilhas de P-nitofenil fosfatase alcalina, para observação da

170 reação. Após 15 minutos a temperatura ambiente visualizou-se coloração amarela nas
171 amostras, sendo em seguida levadas ao leitor de ELISA (ELX 800, Biotek). A leitura das
172 referidas placas foi realizada com filtro com espectro de absorvância a 405 nm, considerando-
173 se as reações dos contrastes positivos e negativos [feijão caupi, *Vigna unguiculata* L. (Walp),
174 infectado com CMV e *Nicotiana benthamiana* L. sadia], respectivamente.

175

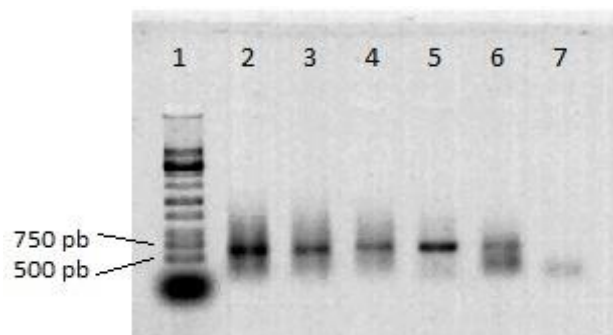
176

RESULTADOS E DISCUSSÃO

177 Quatorze amostras de plantas foram analisadas via RT-PCR, dentre elas apenas cinco
178 (36%) produziram amplicons com tamanhos aproximado de 600 pb, na combinação de
179 primers de GarV-B, a 53 °C (Figura 2).

180

181 Figura 2. Produtos de RT-PCR amplificados em plantas de alho-poró provenientes de Vitória de Santo Antão,
182 PE. 1- Marcador molecular (1 Kb Ladder, Ludwig), linhas 2 a 6- produtos amplificados nas cinco amostras
183 (plantas 2, 11, 12, 13 e 14) e 7- controle negativo (planta sem sintomas de viroses).



184

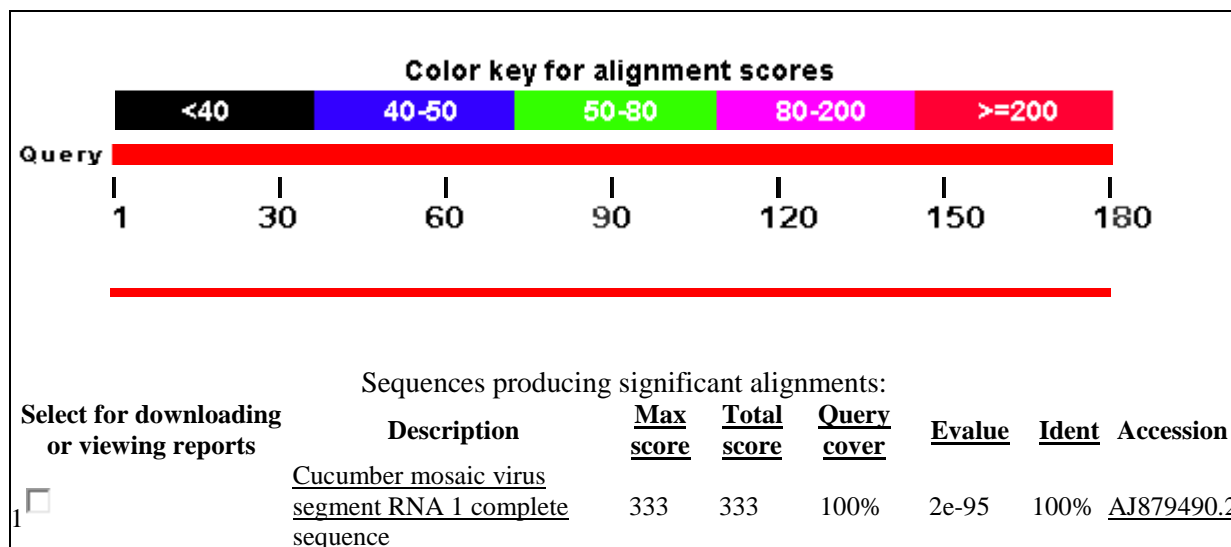
185

186 Após purificação e clonagem dos fragmentos, os DNAs plasmidiais foram sequenciados e
187 analisados no BLAST (www.ncbi.nih.nlm.gov), revelando 100% de homologia com o gene da
188 proteína de replicação de um isolado indiano de *Cucumber mosaic virus* (AJ879490.2), e-
189 value 2e-95 (Figura 3).

190 As sequências do isolado indiano (AJ879490.2) e do identificado em Vitória de Santo Antão
191 foram alinhadas com auxílio do programa CLUSTAL (www.clustal.org/clustal2/).

192

193 Figura 3. Homologia com o gene da capa proteica do isolado indiano de *Cucumber mosaic virus* (AJ879490.2) e
 194 o isolado brasileiro do agreste brasileiro.



195

196 De um total de 567 nucleotídeos obtidos do isolado brasileiro, 186 (33%) coincidiram
 197 totalmente com o isolado indiano, podendo essa sequência se constituir em uma valiosa
 198 ferramenta para construção de sonda, a ser posteriormente utilizada para identificar CMV em
 199 plantas de vírus por Sounther Blot ou qPCR (Tabela 2).

200

201 Tabela 2. Alinhamento das sequencias dos genes da capa protéica de CMV do isolado indiano
 202 (CMV-I) e de Vitoria de Santo Antão (CMV-V), processado com auxilio do programa Clustal
 203

CMV-V	AATCGAATTCCTCCGCGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGT
CMV-I	AATCGAATTCCTCCGCGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGT *****
CMV-V	CGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGC
CMV-I	CGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGC *****
CMV-V	CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCA
CMV-I	CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCA *****
CMV-V	ACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAA
CMV-I	ACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAA *****

204

205 Com relação ao teste de ELISA, verificou-se que apenas a amostra dois apresentou
 206 resultado positivo para CMV, cuja absorbância foi 2,5x acima do controle negativo (Tabela
 207 3).

Tabela 3. Absorbância registrada pelo leitor de ELISA em amostras de alho-poró coletadas em Vitória de Santo Antão, PE. C+ e C-, controles positivo e negativo, respectivamente

Amostra	A ₄₀₅	Resultado
1	0,48	-
2	0,95	+
3	0,38	-
4	0,37	-
5	0,42	-
6	0,33	-
7	0,30	-
8	0,39	-
9	0,56	-
10	0,54	-
11	0,63	-
12	0,63	-
13	0,67	-
14	0,68	-
C+*	1,124	+
C-*	0,35	-

208 * - Plantas de *Phaseolus vulgaris* (feijão caupi) sendo o controle positivo e de *Nicotiana*
 209 *benthamiana* o negativo.
 210

211 Com as análises de PCR foram detectadas cinco amostras positivas, entretanto, na
 212 reação via ELISA apenas uma planta pode ser considerada infectada, mas isso não indica que

213 o vírus não esteja presente em outras amostras envolvidas no teste. A sua inexpressão pode se
214 dar devido a uma baixa concentração de partículas virais na planta, o que corresponde as
215 quatro amostras referentes às plantas 11, 12, 13 e 14, que revelaram absorvência acima de 0,6
216 (Tabela 3).

217 Doenças provocadas por vírus têm causado severas perdas em campos de produção de
218 aliáceas. O conhecimento atual da diversidade de espécies que provocam viroses em plantas
219 do gênero *Allium* ainda é relativamente limitado e necessita de mais investigações,
220 especialmente em alho-poró, devido à escassez de informações.

221 Nesse estudo, um diagnóstico de ocorrência de viroses foi confirmado em campos de
222 produção de alho-poró na região Agreste de Pernambuco, sendo, contudo, o agente causal o
223 CMV, ao invés de *Allexivirus*, como se supunha, preliminarmente. As ferramentas
224 moleculares e sorológicas utilizadas para confirmação foram imprescindíveis para eliminar
225 dúvidas pré-estabelecidas em função de análises de sintomas visuais.

226 Nas análises moleculares, a estratégia de se utilizar primers específicos, flanqueadores
227 de regiões homólogas de *Allexivirus* em aliáceas foi bastante oportuna em função dos
228 elevados danos causados por ácaros nas plantas, embora essa observação isolada não garanta
229 a presença de espécies desses vírus. Com os resultados, contudo, em que se obteve produtos
230 inespecíficos, amplificados em função da flexibilidade da temperatura de anelamento e da
231 coincidência de 50% dos nucleotídeos dos primers utilizados, especificamente de GarV-B,
232 surgiu ao acaso a oportunidade de prospectar a ocorrência de ambas as espécies de vírus,
233 GarV-B e CMV, em aliáceas, com perspectivas de ampliar o leque de informações de
234 ocorrência de viroses desse gênero. Essa inferência se baseia no fragmento gerado de 186 pb,
235 100 % homólogo ao gene da replicase do CMV, situado nas posições 3498 a 3583 do acesso
236 AJ879490.2 (ncbi.nlm.nih.gov), que pode servir como uma excelente sonda para identificação
237 de tais viroses.

238 De acordo com Souza et al. (2008) a obtenção de bandas de anelamentos inespecíficos é
239 algo passível de ocorrer. Por outro lado, ácidos nucléicos que apresentam calda de poli “A”
240 são facilmente preservados como cDNA e por conseguinte, várias espécies de vírus presentes
241 em uma amostra assumem maiores chances de serem preservadas. Ao mesmo tempo,
242 baseando-se no que ocorre na natureza e mais particularmente com relação às primases
243 (LEWIN, 2000), primers com baixa homologia com a fita molde apresentam também chances
244 de anelamento quando submetidos a temperaturas mais baixas. Na população desse estudo,
245 50% dos nucleotídeos dos primers de GarV-B amplificaram inespecificamente em uma região
246 de identidade próxima do genoma de CMV. Isso porque um primer pode detectar mais de um
247 vírus que não aquele específico para o qual foi desenhado (LUNELLO; DUCASSE; CONCI,
248 2005).

249 A detecção de CMV, que tradicionalmente apresenta histórico de danos em várias
250 culturas de importância agrícola, se traduz em um novo problema para produção de alho na
251 região Agreste de Pernambuco, principalmente devido à transmissão se dar por afídeos
252 (PINTO et al., 2008). Fernandes e Dusi (2013) reportam que o controle químico de afídeos
253 eleva sua movimentação de modo a incrementar a visitação entre as plantas circunvizinhas.
254 Tal informação, conjugada à reportada por Lavour (2006), que afirma que afídeos são capazes
255 de transmitir vírus em apenas uma picada de prova, elevam as chances de disseminação dessa
256 espécie no Estado.

257 Cerca de 88% dos vírus de plantas são encontrados tanto nas espécies cultivadas quanto
258 nas invasoras, as quais posteriormente servem como hospedeiro alternativo ao patógeno
259 Petrzik et. al. (2013). Quando não há conhecimento sobre a gama de hospedeiros de uma
260 espécie patogênica, o controle e manejo se tornam comprometidos.

261 O CMV pertence à família *Bromoviridae* e em 1916 foi relatado pela primeira como o
262 agente causal de uma doença em pepino e melão, em Michigan e Nova York. É relatado na

263 maioria dos países do mundo, principalmente em zonas temperadas e atualmente com mais
264 frequência nos países tropicais (PALUKAITIS et al., 1992). Possui uma das maiores gamas
265 de hospedeiros e ao longo dos últimos 60 anos, essa lista tem aumentado relativamente já que
266 atacam culturas ornamentais, plantas daninhas e culturas alimentares, perfazendo um total de
267 mais de 1.300 espécies de plantas em aproximadamente 40 famílias botânicas (PALUKAITIS
268 et al., 2003).

269 Em aliáceas, o controle se dá através da erradicação de hospedeiros alternativos, plantas
270 doentes, controle do vetor e por propagação de plantas livres de vírus, (PALUKAITIS et al.,
271 1992). O uso de plantas resistentes é uma das estratégias mais viáveis, utilizadas no
272 melhoramento genético para minimizar os efeitos do CMV em plantas suscetíveis
273 (CARANTA et al., 1997).

274

275 CONCLUSÕES

276 O presente estudo relata o *Cucumber mosaic virus* em alho-poró em campos de
277 produção, no Agreste de Pernambuco. Com base no levantamento bibliográfico realizado, este
278 até o momento é o primeiro relato do vírus causando doença em *Allium ampeloprasum* var.
279 *porrum* L.

280

281 REFERÊNCIAS

282 ADÃO, C.R.; SILVA, B.P.; PARENTE, J.P. A new steroidal saponin with antiinflammatory
283 and antiulcerogenic properties from the bulbs of *Allium ampeloprasum* var. *porrum*.
284 **Fitoterapia**, v.82, p. 1175-1180, 2011.

285

286 ALMEIDA, A. M. R. **Princípios e Técnicas de diagnose aplicados em Fitovirologia**.

287 Londrina: Embrapa Soja /Brasília, Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2001, 186 p.

288

- 289 BOITEUX, L. S.; MELO, P. C. T. **Taxonomia e origem. In: EMBRAPA HORTALIÇAS.**
290 **Sistema de produção de cebola (*Allium cepa* L.).** Brasília, 2004. Disponível em:
291 <http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_cebola/taxonomia_e_or
292 [igem.htm](http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_cebola/taxonomia_e_or)>. Acesso em: 25 nov. 2013.
- 293
294 CARANTA, C.; PALLOIX, A.; LEFEBVRE, V.; DAUBEZE, A. M. QTLs for a component
295 of partial resistance to *Cucumber mosaic virus* in pepper: Restriction of virus installation
296 in host-cells. **Theoretical and Applied Genetics**. v.94, p. 431- 438, 1997.
- 297
298 CONAB. Companhia nacional de abastecimento. **Indicadores da agropecuária. Brasília:**
299 **CONAB**, 2012. Disponível em:<<http://www.conab.gov.br/conab/Main.php?MagID=3&MagNo=142>>. Acesso em: 6 Jun. 2012.
- 300
301
302 FERNANDES, F. R.; DUSI, A. N. **Viroses da batata-doce no Brasil: importância e**
303 **principais medidas de controle.** Brasília: Embrapa Hortaliças. DF. Abril, 2013. (Embrapa
304 Hortaliças. Circular Técnica 126).
- 305
306 LAVOUR, M. T. F. C. **Atividade biológica de produtos domissanitários para o controle**
307 **alternativo do pulgão-preto no feijão-de-corda.** 2006. 56 p. Dissertação (Mestrado em
308 Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2006.
- 309
310 LEWIN B. **Genes VII.** Oxford: Oxford University Press, 2000. 990 p.
- 311
312 LUNELLO, P.; DUCASSE, D.; CONCI, V. Improved PCR detection of potyviruses in *Allium*
313 species. **European Journal of Plant Pathology**, v. 112, n. 4, p. 371-378. 2005.
- 314
315 MELO FILHO, P. A.; NAGATA, T.; DUSI, A. N.; BUSO, J. A.; TORRES, A. C.; EIRAS,
316 M.; RESENDE, R. O. Detection of three allexivirus species infecting garlic in Brazil.
317 **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n. 8, p. 735-740, 2004.

- 318
319 MOURA, A. P.; GUIMARÃES, J. A.; FERNANDES, F. R.; MICHEREFF FILHO, M.
320 **Recomendações técnicas para o manejo integrado de pragas da cultura do alho.** Brasília:
321 Embrapa hortaliças, 2013. 12p. (Comunicado técnico 118).
- 322
323 PALUDAN, N. Virus attack on leek: Survey, diagnosis, tolerance of varieties and winter
324 hardiness. **Tidsskrift for Planteavl**, p.371-385, 1980.
- 325
326 PALUKAITIS, P.; GARCIA ARENAL F. Cucumoviruses, **Advances in Virus Research**,
327 v.62, p. 241, 2003.
- 328
329 PALUKAITIS, P.; ROOSSINCK, M. J.; DIETZGEN, R. G.; FRANCKI, R. I. B. *Cucumber*
330 *mosaic virus*. **Advances in Virus Research**, v.41, 281–348, 1992.
- 331
332 PETRZIK, K.; VONDRÁK, J.; BARTÁK, M.; PEKSA, O.; KUBEŠOVÁ, O.; Lichens - a
333 new source or yet unknown host of herbaceous plant viruses? **European Journal of Plant**
334 **Pathology**, v.138, p. 549-559, 2013.
- 335
336 PINTO, Z. V.; REZENDE, J. A. M.; YUKI, V. A.; PIEDADE, S. M. S. Ability of *Aphis*
337 *gossypii* and *Myzus persicae* to Transmit *Cucumber mosaic virus* in Single and Mixed
338 Infection with Two Potyviruses to Zucchini Squash. **Summa phytopathologica**, v.21, n.2,
339 2008.
- 340
341 SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning : a Laboratory manual. 3rd. ed.**
342 N.Y: Published Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory press, 2001.
- 343
344 SCHWARTZ, H. F.; OTTO, K. First Report of Iris yellow spot virus in Commercial Leek
345 (*Allium porrum*) in the United States. **Plant disease**, v.91, n.10, p. 1,365.2-1,365.2, 2007.
- 346

- 347 SOUZA, K. K.; KLEIN, C. S.; KICH, J. D.; COLDEBELLA, A.; ALBERTON, G. C.
348 Otimização da técnica da PCR para a detecção de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Ciência**
349 **Rural**. v.38, n.8, 2008.
- 350
351 VAN DIJK, P. Carlavirus isolates from cultivated Allium species represent three viruses.
352 **Netherlands Journal of Plant Pathology**. v. 99, p.233–257, 1993.
- 353
354 VIEIRA, R. L. **Aspectos fisiológicos e fitossanitários na micropropagação para a**
355 **obtenção de alho semente livre de vírus**. 2012, 193f. Tese (Doutorado em Recursos
356 Genéticos Vegetais) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

CONCLUSÕES GERAIS



CONCLUSÕES GERAIS

1. O alho-poró é hospedeiro do *Cucumber mosaic virus* e pelo levantamento feito na literatura neste momento, não foi verificado outro relato de CMV em alho-poró no mundo.
2. Mesmo em baixa concentração de partículas virais nas amostras o teste imunoenzimático ELISA foi eficaz para confirmar a presença de CMV em plantas de alho-poró.
3. As amostras testadas não estavam contaminadas com *Allexivirus*.