

Cultivo *in vitro* do alho visando a limpeza clonal

Garlic in vitro culture for clonal recovering virus-free plants

Francisco Olmar Gervini de Menezes Júnior¹

Recebido em 30/04/2010; aprovado em 17/06/2011.

RESUMO

As doenças causadas por vírus em plantas de alho têm causado perdas significativas de produção e produtividade. A principal estratégia utilizada para superar tais problemas tem sido o uso de material propagativo sadio oriundo do cultivo *in vitro*. O procedimento inicial para produção *in vitro* consiste na escolha de bulbos de maior tamanho e melhor aspecto sanitário. Posteriormente, os bulbos são vernalizados e submetidos à termoterapia. Após, são excisados meristemas que serão inoculados em meio de cultura MS sob concentrações de reguladores de crescimento indutoras da parte aérea. O material é então transferido em meio MS para a promoção do enraizamento e bulbificação *in vitro*. Os microbulbos obtidos são então vernalizados e levados à climatização. Posteriormente, as plantas obtidas são indexadas para os principais vírus que infectam a cultura, processo repetido até o momento em que se tenha certeza que o material encontra-se “livre de vírus”. Finalmente, os materiais são multiplicados em campo e distribuídos a produtores de alho-semente. Conclui-se que o cultivo *in vitro* de meristemas é o principal método de obtenção de plantas “livres de viroses” na cultura do alho.

PALAVRAS CHAVE: *Allium sativum* L., micropropagação, climatização, indexação.

SUMMARY

Viral diseases have been promoting significant losses in garlic plant production. The main strategy to overcome these problems has been the use of healthy propagation material obtained by tissue culture. The initial procedure for producing garlic *in vitro* consists in choosing bulbs of larger size and better phytosanitary aspect. After the cloves are vernalized and submitted to thermotherapy. From this material, the explants are excised and inoculated in MS medium under concentrations of inductor growth regulators, in order to promote in sequence shoot, rooting and *in vitro* bulbification. The obtained microbulblets are vernalized and acclimatized at a protected environment. A posteriori, the obtained plantlets are indexed to the main viruses that infected the culture. This process is repeated until the material is clearly virus-free. Finally, these materials are multiplied in field conditions and distributed to “seed” farmers. It was concluded that *in vitro* garlic culture is the main method employed for clonal recovering virus-free plants.

KEY WORDS: *Allium sativum* L., micropropagation, acclimatization and indexing.

INTRODUÇÃO

O alho é uma das mais antigas espécies oleráceas cultivada pelo homem, devido a sua indiscutível importância como condimento, valor

¹ Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). Estação Experimental de Ituporanga, Estrada Geral 453, C.P. 121, CEP 88400-000, Ituporanga, SC, Brasil. Email: franciscomenezes@epagri.sc.gov.br.

nutritivo e terapêutico e geração de emprego e renda. Em 2005, a produção mundial de alho foi de aproximadamente 14,7 milhões de toneladas, sendo a China o maior produtor (11 milhões de toneladas) e exportador mundial e a Argentina o maior produtor sul-americano (116 mil toneladas). Naquele ano, o Brasil, um dos maiores consumidores mundiais e que chegou a abastecer 90% do consumo nacional na safra de 1988/89, produziu apenas 86 mil toneladas (OLIVEIRA et al., 2004; FAO, 2007; LUCINI, 2008). Embora a produção nacional de alho venha crescendo, atingindo 87,7 mil toneladas na safra 2006/2007, nosso país é ainda dependente do alho importado da China e Argentina (EPAGRI/CEPA, 2008). A atratividade do mercado chinês, com uma população que supera mais de um bilhão e trezentos milhões de habitantes, contribui para que muitas concessões sejam feitas. No caso brasileiro, há grande interesse na exportação de “commodities”, tais como a soja, a carne e o café. Em 2007, a Argentina estabeleceu-se como o segundo maior exportador mundial, exportando 67% das 120 mil toneladas produzidas, desse percentual 72% foram adquiridos pelos importadores brasileiros (AGROAR.INFO, 2008).

O despreparo do produtor brasileiro, a agressividade mercadológica chinesa, a existência de uma linha completa para exportação de derivados via Internet, o interesse dos importadores nacionais e a falta de políticas governamentais efetivas têm prejudicado os produtores brasileiros. Apesar desta conjuntura, devem ser ressaltados os resultados obtidos nos últimos anos, oriundos dos esforços realizados pelos órgãos de pesquisa e extensão e pela sociedade civil organizada. Além das questões mencionadas, uma das estratégias adotadas para o aumento em produtividade tem sido a cultura de tecidos vegetais. Essa técnica propicia que culturas propagadas por via vegetativa recuperem-se da degenerescência causada pelo acúmulo de viroses estabelecida ao longo dos ciclos de cultivo. O presente trabalho teve por objetivo apresentar uma revisão de literatura sobre as principais técnicas de micropropagação utilizadas na cultura do alho com vistas à obtenção de material propagativo “livre de viroses”.

DESENVOLVIMENTO

Principais viroses do alho

A propagação assexuada do alho, através bulbilhos, favorece o acúmulo e a disseminação de viroses ao longo dos ciclos de cultivo. Tal fato acarreta perdas significativas na qualidade e produtividade, que pode chegar a mais de 50% (MASUDA et al., 1994; YURI et al., 2004). Devido às viroses no alho não provocarem a morte das plantas, sua importância foi subestimada durante muito tempo, mas recentemente esses fitopatógenos passaram a receber maior atenção. Os vírus são hospedeiros obrigatórios que se valem do aparato celular deste para sua sobrevivência e replicação. Ao penetrar na célula, direcionam os processos metabólicos à síntese do ácido nucléico e de proteínas virais. De acordo com Gibbs e Harrison (1979 apud MUELLER et al., 2005), a infecção viral ocasiona distúrbios celulares que afetam a síntese de proteínas e, desta forma, a fotossíntese, além do transporte de assimilados e ação de fitormônios, processos que têm como consequência a debilitação da planta e redução da produção.

No alho as infecções virais produzem estrias cloróticas foliares com colorações variáveis do amarelo-claro ao verde-claro, nanismo e redução do tamanho dos bulbos. Tais sintomas podem ser causados por diferentes vírus. A distinção entre os diferentes agentes causais é dificultada devido à maioria das cultivares comerciais de alho plantadas encontrarem-se infectadas por mais de um vírus. Os complexos virais mais citados na bibliografia são formados por vírus pertencentes aos gêneros *Potyvirus*, *Carlavirus*, *Allexivirus* e *Fijivirus* (MATSUBARA e CHEN, 1989; LUNELLO et al., 2007). Os *Potyvirus* considerados mais importantes são o “Onion yellow dwarf virus garlic strain” (OYDV-G) e o “Leek yellow stripe vírus” (LYSV). Além desses, já foram identificados no Brasil um *Carlavirus*, o “Garlic common latent vírus” (GarCLV) e, em *Chenopodium quinoa*, o “Garlic virus C” (GarV-C), o “Garlic virus D” (GarV-D) e o “Garlic mite-borne filamentous vírus” (GarMbfV) pertencentes ao gênero *Allexivirus* (FAJARDO et al., 2001; TORRES et al., 2001; BECKER, 2004;

MELO FILHO et al., 2004).

Estudos realizados por Fajardo (1998) confirmaram, por meio do uso da reação de polimerase em cadeia, de sondas moleculares e do seqüenciamento de nucleotídeos, a infecção do alho brasileiro por um complexo viral composto, no mínimo, pelos vírus OYDV-G, LYSV e GarCLV. Os danos causados pelos vírus são maiores quando são estabelecidos complexos virais. Lunello et al. (2007) compararam plantas “livres de vírus” com plantas infectadas por um isolado argentino de LYSV e plantas infectadas por um complexo viral (*Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus*). Os piores resultados foram observados nas plantas infectadas com o complexo viral. Nessas, houve queda na porcentagem de emergência e redução de 74% no peso dos bulbos, enquanto, as plantas infectadas somente pelo isolado LYSV reduziram em 28% o peso dos bulbos.

Medidas de manejo de viroses

Os vírus têm por características se disseminar com facilidade por meio de insetos vetores e entre gerações no material propagativo, o que diminui a eficácia dos métodos convencionais de controle. Como não se dispõem de variedades de alho resistentes e/ou tolerantes, o manejo de viroses a campo é muito difícil. Recomenda-se a associação de práticas culturais que favoreçam o pleno desenvolvimento das plantas, dificultem a disseminação e reduzam a infecção das plantas no cultivo, como: uso de propágulos sadios, evitar cultivos sucessivos e próximos a lavouras mais velhas, controlar plantas hospedeiras de viroses e afídeos e eliminar restos culturais de lavouras contaminadas. Além dessas medidas, o cultivo *in vitro* se destaca pela facilidade de condução e eficácia no manejo de viroses na cultura do alho (GHINI e BETIOL, 1995; SOUZA et al., 2002).

A cultura de tecidos em alho

Aspectos básicos da cultura de tecidos vegetais e relações com a limpeza clonal

Em 1902, Haberlandt lançou o princípio básico da cultura de tecidos vegetais, denominando-o totipotencialidade, segundo o qual qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa (PASQUAL, 2001a; GUERRA e NODARI, 2006). De acordo com Kerbauy (2008), isso significa que as células vegetais são autônomas e têm a potencialidade de regenerar plantas quando submetidas a tratamentos adequados. A propagação dos vírus de uma geração a outra pode ser evitada ou reduzida, por meio da multiplicação intermediária *in vitro* do material propagativo infectado que permite quebrar o ciclo reprodutivo dos vírus, recuperar o vigor vegetativo e resgatar a produtividade das cultivares. Embora o controle dos vírus não seja total, a regeneração das plantas *in vitro* permite a obtenção de taxas de 80 a 95% de plantas livres de vírus (SOUZA et al., 2002).

É importante considerar que em plantas adultas o crescimento de brotações se restringe aos meristemas, os quais são tecidos especializados localizados nos ápices das gemas principais e laterais, com tamanho menor que 0,1 mm. As células deste tecido são pouco diferenciadas e retêm a capacidade embrionária para divisões ilimitadas, sendo consideradas organogênicas. Por sua vez os ápices caulinares são estruturas de 0,2 a 20 mm ou mais, constituídas do meristema apical e de primórdios subjacentes, podendo incluir folhas emergentes (TORRES et al., 1998).

A cultura de ápices meristemáticos e caulinares tem sido utilizada para a propagação de plantas *in vitro*, recuperação de plantas livres de vírus, conservação e intercâmbio de germoplasma e transformação. Uma das vantagens deste sistema diz respeito à manutenção, em geral, da identidade do genótipo regenerado, em virtude das células dos meristemas possuírem a tendência de se manterem geneticamente estáveis, característica de interesse na produção de clones. A cultura do

verdadeiro meristema raramente é usada, devido à menor praticidade em seu isolamento e baixa taxa de sobrevivência *in vitro*. Reconhece-se que os primórdios foliares, presentes nos ápices caulinares em desenvolvimento, sintetizam substâncias orgânicas essenciais que favorecem o crescimento *in vitro*. Devido a isso, o uso de ápices meristemáticos ou caulinares, com 0,2 a 0,5 mm, tem sido preferido (MURASHIGE e SKOOG, 1962; TORRES et al., 1998; PASQUAL et al., 2001a).

De acordo com Quak (1966 apud PASQUAL et al., 2001a), e Souza et al. (2002), as seguintes hipóteses para a ausência de viroses nas plantas obtidas *in vitro* têm sido consideradas: a) em meristemas não há competição entre partículas virais e a produção de células. A intensa multiplicação celular no meristema inibiria a multiplicação do vírus; b) durante a divisão celular, a capacidade para a síntese de ácidos nucleicos é empregada para a produção de células em detrimento à multiplicação do vírus; c) a ausência de tecidos vasculares no meristema dificulta o transporte de partículas virais de outras partes da planta para esta estrutura; d) presença de inibidores naturais nos meristemas e/ou em substâncias do meio de cultivo que interfeririam na multiplicação dos vírus.

Plantas de alho livre de vírus apresentam melhor desenvolvimento vegetativo no ciclo, aumentos de produtividade acima de 100% e podem ter menor perda no armazenamento do que plantas viróticas (TORRES et al., 1998; SILVA et al., 2000). Como o cultivo *in vitro* não garante a exclusão de todos os vírus, a denominação “planta livre de vírus” deve ser reservada para os vírus aos quais a planta foi indexada.

Procedimentos para a produção de propágulos – clones “livres de vírus”

Condições da planta matriz, fontes de explantes e vernalização

A melhor época para coleta dos explantes de alho corresponde ao período em que os bulbos iniciam sua brotação. Os melhores explantes são

obtidos a partir de plantas matrizes vigorosas, isentas de estresses bióticos e abióticos e em pleno crescimento vegetativo. Para tal, é comum mantê-las em câmaras de crescimento ou em ambientes protegidos, com telas anti-insetos de 50 mesh, mantidas isoladas do solo em recipientes preenchidos com substratos, irrigadas e/ou fertirrigadas por gotejamento sob um regime hídrico adequado. Dessa forma se reduz ao máximo o estresse e a contaminação quando do estabelecimento *in vitro*. Esse procedimento, por permitir uma brotação mais intensa, aumenta o rendimento de explantes por planta matriz (PASQUAL et al., 2001a).

A sanidade da planta-matriz é um dos principais fatores que afetam o estabelecimento *in vitro*. Em geral, a infecção da planta-matriz reduz o número e tamanho das brotações, além do número final de plantas que serão produzidas. No cultivo *in vitro*, microrganismos como bactérias endógenas, por serem inespecíficos, muitas vezes conseguem infestar os explantes apesar do uso de técnicas de assepsia, originando contaminações. Recomendam-se pulverizações com fungicidas e bactericidas de amplo espectro nos dias anteriores à coleta do explante (PASQUAL et al., 2001a; DUSI, 2004).

A limpeza clonal via cultura de meristemas é dificultada pela reduzida taxa de multiplicação e parca quantidade de material para produção comercial. A vernalização das plantas matrizes em câmaras frias auxilia no estabelecimento das plantas *in vitro*, ao possibilitar melhor índice de multiplicação dos bulbos e maior eficácia e rapidez da multiplicação clonal *in vitro*. Yuri et al. (2004), compararam seis períodos de vernalização (40; 50; 60; 70; 80 e 90 dias) observando que ápices caulinares de plantas matrizes da cultivar Roxo Pérola de Caçador, mantidos a $5 \pm 2^\circ\text{C}$, sob 90 dias de vernalização, apresentaram os melhores resultados para as variáveis bulbo/meristema/tubo (1,81), massa fresca total das plantas (235,32 mg planta⁻¹) e dos bulbos (110,51 mg bulbo⁻¹). Verificaram também que em 90 dias (58,68 mg bulbo⁻¹) houve uma produção de bulbos 79,29 % superior ao tratamento com 60 dias. O aumento do tempo de vernalização tende a aumentar o

número de bulbilhos pela modificação do balanço hormonal, estimulando o acúmulo de citocininas e giberelinas, tendo como resposta a quebra da dormência e aceleração na brotação dos bulbilhos (CARVALHO et al., 1980; FERREIRA et al.; 1986). Além destes, outros fatores como a luminosidade e pré-tratamentos com reguladores de crescimento podem afetar o crescimento ou morfogênese de explantes *in vitro* (PASQUAL et al., 2001a).

O uso da termoterapia

A termoterapia consiste na aplicação de uma dada relação temperatura-tempo ao material propagativo que tenha a capacidade de reduzir ou eliminar o patógeno e produzir poucos efeitos deletérios no hospedeiro. Normalmente, é aplicada ao material propagativo temperatura acima de 30°C por um período de tempo variável com a suscetibilidade do patógeno e capacidade regenerativa do hospedeiro. O mecanismo de ação da temperatura é complexo, tanto no controle dos patógenos quanto na injúria do hospedeiro, podendo envolver um ou vários fatores, como a desnaturação de proteínas, destruição de hormônios, injúria metabólica e aptidão das plantas em se recuperar dos danos causados pelo tratamento, entre outros (GHINI e BETTIOL, 1995). A associação da termoterapia com o cultivo *in vitro* auxilia na redução do “pool” de viroses, diminuindo ainda mais os efeitos deletérios sobre a produtividade da cultura. A técnica consiste em submeter o material propagativo (bulbilhos), a temperatura que varia entre 30 e 40°C, por um período de 30 a 45 dias ou mais, em câmara seca em ar quente, antes da retirada dos explantes (ROBERT et al., 1998; TORRES et al., 2000; SOUZA et al., 2002).

Material utilizado como fonte de explante e procedimentos para o cultivo *in vitro*

Selecionam-se bulbos de maior tamanho e de melhor aspecto fitossanitário para servir de fonte de explante. Em seguida, os bulbilhos são vernalizados e submetidos à termoterapia.

Dependendo da metodologia adotada, os bulbilhos podem fornecer diretamente os explantes ou serem cultivados para brotar sob condições controladas (SOUZA et al., 2002; SCOTTON, 2007). No primeiro caso, os bulbilhos são primeiramente vernalizados, por exemplo, para as cultivares Amarante e Caçador, em câmara frigorífica a 4°C até atingirem um índice visual de superação de dormência de 80%. Em seguida, estes são selecionados por tamanho para homogeneizar o crescimento *in vitro* e submetidos à termoterapia. Ao fim dessa etapa, ápices de 0,1 a 0,2 mm são desinfestados (hipoclorito de sódio a 0,5% por 20 minutos), lavados com água destilada e estéril, para posterior excisão do meristema apical com um primórdio foliar e porção subjacente do caule em câmara de fluxo laminar (TORRES et al., 2001). Alternativamente (SCOTTON, 2007), recomenda-se que após a retirada das películas protetoras os bulbilhos sejam imersos em etanol 70% (v/v) por 5 minutos, seguindo-se da desinfestação em hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v), adicionando-se duas gotas de Tween-20 para 100 mL de solução, sendo o tratamento mantido por 20 minutos. Em seguida, aconselha-se que sejam lavados dez vezes com água destilada estéril antes da excisão dos bulbilhos em câmara de fluxo laminar. No segundo caso, os bulbilhos são lavados em água corrente por 3 horas, submersos em 40% de solução comercial com hipoclorito de sódio a 20% acrescida de duas gotas de Tween-20 por 20 minutos. Em sequência, os bulbilhos são lavados em água destilada estéril. Alternativamente, podem ser retiradas as folhas de proteção dos bulbilhos e realizada a desinfestação (hipoclorito de sódio a 20% por 15 minutos). Em ambos os casos, após a desinfestação, os bulbilhos são inoculados em frascos de 200 mL, contendo vermiculita ou algodão hidrófilo esterilizados e umedecidos com água destilada, e mantidos a 26°C no escuro por três dias para sua germinação (PASQUAL et al., 2001a; SOUZA et al., 2002). Após, retiram-se a parte aérea e as raízes dos bulbilhos brotados e se faz nova assepsia em câmara de fluxo laminar (hipoclorito de sódio ou imersão em álcool 90°C e flambagem rápida). Em seguida, retiram-se as

folhas de reserva, isolando o caulículo, faz-se outra assepsia, removendo os meristemas sob estereomicroscópio (0,2 a 0,5 mm).

A metodologia de retirada dos meristemas consiste na excisão da cúpula meristemática apical com um ou dois primórdios foliares, onde ainda não se observa conexão vascular com os tecidos da planta, priorizando o uso de propágulos com menos de 0,4 mm, pois acima desta medida há maior possibilidade dos explantes serem viróticos. Após a excisão os meristemas são inoculados em meio de cultura em recipientes, como frascos de vidro ou tubos de ensaio previamente esterilizados por autoclavagem (15 minutos a 121°C e 1,5 atm). Recomenda-se que sejam depositados 20 mL do meio de cultura e inoculado apenas um meristema por tubo, no caso de tubos de ensaio de 25 x 150 mm, o que reduz o risco de contaminação *in vitro* (TORRES et al., 2001; SCOTTON, 2007).

Dentre os meios utilizados no cultivo *in vitro*, destaca-se o recomendado por Murashige e Skoog (1962), conhecido como cultivo MS. Para a indução da parte aérea ao meio MS é acrescido 0,5 mg L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA) e 0,5 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP). Torres et al. (2001) têm obtido bons resultados com o MS acrescido com 0,1 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e 0,1 mg L⁻¹ de 2-isopenteniladenina (2iP). O ANA e o AIB são auxinas necessárias para a promoção do crescimento inicial dos ápices caulinares. Em concentrações adequadas promovem o crescimento sem a indução de calo, o qual é indesejável na reprodução de clones. Por sua vez, o BAP e o 2iP são citocininas necessárias para o estímulo da divisão celular para promover o início de brotações juntamente com a auxinas. Altas concentrações de citocininas geralmente inibem ou retardam a formação de raízes e, devido a isso, são omitidas do meio de cultura no estágio de enraizamento.

Um dos problemas que se enfrenta no cultivo *in vitro* do alho é a baixa taxa de multiplicação *in vitro*. O ajuste da composição do meio de cultura para cada genótipo pode aumentar essa taxa. Rossi et al. (1995), utilizando o meio MS modificado, acrescido de thidiazuron (TDZ),

e de uma citocinina sintética, obtiveram uma proliferação no número de bulbos por meristema na razão de 1:4,5, para a cultivar Piacentiano Bianco.

Após introdução *in vitro*, os meristemas inoculados em meio de cultura são incubados em câmara de crescimento, com intensidade luminosa de 62 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 \pm 2°C, por um período aproximado de 30 dias. Após, em meio sólido ou líquido, promove-se a bulbificação *in vitro*. No primeiro caso, os meristemas são inoculados em meio MS contendo apenas BAP e, após seu desenvolvimento, as plântulas são transferidas a outro meio sólido com ANA, onde ocorre o enraizamento e a bulbificação das plantas. Torres et al. (2001), indicam que, nesta etapa, as brotações com microbulbos na base sejam transferidas para um meio de cultura MS com 6% de sacarose e 0,2% de gelrite, adicionando-se as seguintes vitaminas: mio-inositol (100 mg L⁻¹), glicina (2,0 mg L⁻¹), tiamina.HCl (1,0 mg L⁻¹), piridoxina.HCl (0,5 mg L⁻¹) e ácido nicotínico (0,5 mg L⁻¹). No método em meio líquido, os propágulos são transferidos para o meio MS, sem nitrogênio (ou com 15 mM de N) e sem reguladores de crescimento. Para facilitar o acúmulo de reservas, aumenta-se a concentração de sacarose para 6%. Na bulbificação *in vitro*, em meio sólido ou líquido, a incubação dos propágulos é realizada sob as mesmas condições de incubação empregadas anteriormente (PASQUAL et al., 2001a; SOUZA et al., 2002).

Após 30 a 50 dias, dependendo da cultivar, os bulbilhos são colhidos, lavados, curados e armazenados em temperatura ambiente por no mínimo de 30 dias ou vernalizados a 5°C por dez dias para a superação da dormência (PASQUAL et al, 2001a; SOUZA et al., 2002). Torres et al. (2001) recomendam que a colheita seja realizada após 60 a 80 dias, estando os microbulbos com 4 a 8 mm de diâmetro. Nesse caso, os microbulbos são secos ao ar e, para a quebra de dormência, mantidos em câmara fria a 4°C por um período de 60 dias. Em seguida, os bulbilhos ou microbulbos são levados à climatização, etapa considerada a mais crítica de todo processo devido ao grande

risco de perda do material cultivado. O objetivo desta fase é adaptar as plantas provenientes dos bulbilhos ou microbulbos obtidos *in vitro* às condições *ex vitro* (MATSUBARA e CHEN, 1989; SOUZA et al., 2002).

A climatização pode ser realizada em ambiente protegido com telas de sombreamento e anti-insetos com sistema de nebulização e antecâmara com pedilúvio. Os bulbilhos são plantados em bandejas de 128 células ou vasos preenchidos com substratos esterilizados em estufa (80°C por 24 horas) ou em autoclave. Os vasos podem conter compostos a base de solo, esterco, areia, vermiculita e casca de pinus; areia e vermiculita (1:1, v/v) ou a base de vermiculita. Irriga-se diariamente com água destilada e, semanalmente, com solução de Hoagland ou de sais do meio MS.

Em geral, materiais utilizados de forma isolada como perlita e vermiculita, ou perlita com vermiculita, não são adequados para a climatização de plântulas de alho cultivadas *in vitro* (OSAWA e SUGAWARA, 1980). A parte mais difícil da climatização da cultura é manter um conteúdo adequado de água até a formação de raízes novas. Matsubara e Chen (1989) avaliaram a climatização de microbulbos de alho obtidos *in vitro* a partir de meristemas em substrato a base de lã de rocha, vermiculita e solo esterilizados. O trabalho foi conduzido em câmara de crescimento ajustada a temperatura de 15, 20 ou 25°C, 16 horas de luz artificial diária com 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e com a adição de uma solução nutritiva comercial (solução Otsuka Co., Japan). Todas as plantas sobreviveram nos substratos de climatização testados após 30 dias a 15 e 20°C, seguido de 30 dias de cultivo no campo, exceto em vermiculita a 15°C, onde a sobrevivência foi baixa.

Esta fase tem a duração aproximada de 3 a 4 meses e cada explante tem a capacidade de gerar um pequeno bulbo com 4 a 5 bulbilhos. Os materiais oriundos da cultura de tecidos e que não brotam podem ser recolhidos, lavados, secos ao ar e novamente mantidos em câmara fria para a quebra de dormência (PASQUAL et al, 2001a; TORRES et al.; 2001; SOUZA et al., 2002).

Indexação

A indexação é uma etapa fundamental na obtenção de materiais vegetais “livres de vírus”, tendo por objetivo identificar os clones isentos de viroses pelas técnicas de cultura de tecidos (TORRES et al.,1998; SOUZA et al., 2002). Dentre os métodos de indexação, destacam-se os sorológicos, os de microscopia eletrônica associados aos métodos sorológicos e as técnicas moleculares.

Para plantas de alho obtidas *in vitro*, destacam-se os métodos sorológicos floculação de látex sensibilizado e o imunoenzimático ELISA. No primeiro, os testes são realizados com antissoro obtido a partir de folhas de plantas infectadas pelo LYSV e OYDV, considerados os vírus de maior ocorrência nas condições brasileiras. Uma pequena gota de antissoro sensibilizado com látex é pingada numa placa de Petri com o suco obtido da maceração do bulbilho do clone a ser testado. Nas amostras infectadas ocorre coagulação em reação a presença do antissoro (SOUZA et al., 2002). O método imunoenzimático ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assay) destaca-se por ser considerado um dos mais sensíveis, eficientes e rápidos, permitindo testar um grande número de amostras por vez para a detecção de vírus. Este tem por base o uso de uma enzima conjugada a moléculas de anticorpo (gamma-globulina) para detectar partículas virais atraídas por anticorpos aderidos a um meio sólido. Entre as limitações desse método citam-se: a necessidade do laboratório possuir um antissoro específico para cada um dos vírus a ser testado (controles negativos), a inexistência de antissoros específicos de alta qualidade e o pouco conhecimento dos vírus que ocorrem na cultura (TEIXEIRA, 1996; TORRES et al., 1998; PASQUAL et al., 2001a; SOUZA et al., 2002). Utilizando o método ELISA, Verbeek et al. (1995) verificaram uma eficiência de limpeza 100% de viroses no cultivo *in vitro* de meristemas de alho para LYSV-G, 92 % para OYDV-G, 62 % para GCLV e menos de 54 % para OMbLV-G. A indexação também pode ser feita pela observação de extratos foliares de alho em microscópio

eletrônico, método este pouco empregado devido ao seu alto custo e necessidade de mão-de-obra especializada (MASUDA et al., 1994). Utiliza-se também a combinação de métodos sorológicos com a microscopia eletrônica, o chamado ISEM (Immunosorbent Electron Microscopy). Esse método possui alta eficiência de observação. Nesse caso, a amostra é tratada com o antissoro e, então, observada no microscópio eletrônico. Técnicas moleculares como o uso de sondas radioativas e não radioativas e a reação de polimerase em cadeia têm sido adotadas onde os testes sorológicos não são eficientes (TORRES et al., 1998).

Os clones sadios confirmados pela indexação são multiplicados em ambiente protegido com tela antiáfidos, em locais de temperaturas amenas e afastado de lavouras comerciais. Nestas áreas, as populações de vetores de viroses como tripes e pulgões são reduzidas e existem riscos menores de reinfecção. Estes procedimentos permitem a manutenção de estoques de bulbos pré-básicos de alta qualidade (SOUZA et al., 2002; MUELLER et al., 2005).

A Multiplicação *in vitro* e as variações somaclonais

O cultivo *in vitro* de ápices caulinares de alho regenera somente uma planta, com isso, a cultura de calos é pesquisada para a obtenção de um maior número de plântulas. Um alta formação de calos foi observada por Kehr e Schaeffer (1976) e Osawa et al. (1981), citados por Matsubara e Chen (1989), tendo como meio inicial o MS com 3 mg L⁻¹ de ácido (2,4-diclorofenoxi) acético (2,4-D) e, como meio de subcultivo, o MS com 1,0 mg L⁻¹ ANA e cinetina ou 2,25 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 2,4-D; porém, nesse caso, são constatadas anormalidades cariogênicas nas células dos calos.

Scotton (2007) também obteve grande sucesso na promoção da calogênese em segmentos radiculares de alho de cultivares nacionais com o emprego do meio de cultura recomendado por Zheng et al. (2003 apud SCOTTON, 2007), tendo por objetivo a transformação genética. Esse é

composto pelo meio MS, acrescido de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0,1 mg L⁻¹ de isopentenil adenina (iP) e 0,2 mg L⁻¹ de caseína hidrolisada. Nesse caso, os explantes devem ser subcultivados a cada 30 dias, durante dois meses no escuro e à temperatura de 27 ± 2°C. Segundo DOLEZEL et al. (1986 apud TEIXEIRA, 1996), plantas originadas de calos podem, apresentar anormalidades fenotípicas, além de variações cariotípicas, as quais são também observadas mesmo naquelas regeneradas sem alteração no número de cromossomos.

Devido à multiplicação *in vitro* de meristemas não passar pela fase de calo, utilizar concentrações baixas e equilibradas de reguladores de crescimento e, principalmente por ter um número reduzido de subcultivos, surgem poucas variações somaclonais. Este fato torna a micropropagação via ápices caulinares o principal e mais eficaz método utilizado à obtenção de clones livres para as viroses indexadas (KAUSHAL et al., 2004; SCOTTON, 2007).

As variações somaclonais baseadas na indução *in vitro* de um calo a partir de explantes de alho adequados, como segmentos radiculares, suspensões celulares, ápices radiculares e meristemáticos, discos basais e foliares, obtidas a partir de técnicas de transformação genética de alho via biobalística ou via *Agrobacterium tumefaciens*, e a posterior seleção de mutantes com características desejáveis, são ferramentas promissoras no melhoramento vegetal do alho, o qual tem sido tradicionalmente limitado à seleção clonal de genótipos mutantes, como forma de obtenção de novas cultivares (BARRUETO CID, 1991; PASQUAL et al., 2001b; SOUZA et al., 2002; HAQUE et al. 2003; SCOTTON, 2007).

CONCLUSÕES

O cultivo *in vitro* de plantas de alho com vistas à obtenção de plantas livres de vírus constitui-se hoje numa das principais aplicações práticas da cultura de tecidos vegetais. O uso das metodologias citadas tem proporcionado a obtenção de 80% de plantas livres para os vírus indexados. Os avanços obtidos, associados às

técnicas moleculares e de transformação genética em desenvolvimento, abrem perspectivas para um melhor entendimento e aperfeiçoamento das metodologias empregadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROAR.INFO Argentina ES El segundo exportador de ajo en el mundo. Disponível em: <http://www.agroar.info/index.php/Comercio-Exterior/argentina-es-el-segundo-exportador-de-ajo-en-el-undo.html> Acesso em: 31 out. 2008.
- BARRUETO CID, L. P. **Regeneração de plantas de alho (cv. Chonan) via suspensão celular**. 1991. 191p. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-graduação Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.
- BECKER, W.F. **Doenças do alho: sintomatologia e controle**. Florianópolis: Epagri, 2004. 53p. Boletim Técnico, 126.
- CARVALHO, C.G.S. et al. Efeito de tratamentos pré-plantio de bulbilhos de alho cv. Amaranthe. **Revista de Olericultura**, Viçosa, v.15, n.1, p.165-173, 1980.
- DUSI, A.N. et al. **Controle de qualidade de produção de alho-semente da cultivar Amaranthe por meio de marcadores RAPD**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 15p. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 61.
- EPAGRI/CEPA. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina: 2007-2008**. Florianópolis, 2008. 322p.
- FAO. **Statistical Databases**. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 12 jun. 2007.
- FAJARDO, T.V.M. et al. Garlic viral complex: Identification of Potyviruses and Carlaviruses in Central Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.619-626, 2001.
- FAJARDO, T.V.M. **Estudo da degenerescência por viroses e caracterização molecular do complexo viral da cultura do alho (*Allium sativum* L.)**. 1998. 113p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 1998.
- FERREIRA, F.A. et al. Dormência de bulbos de alho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 2, p.3-7, 1986.
- GHINI, R., BETTIOL, W. Controle físico. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIM, L. (eds.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.786-803. v.1.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Apostila de Biotecnologia – LFDGV/CCA/UFSC**. Florianópolis: Edição da Steinmacher, 2006. 41p.
- HAQUE, M.A. et al. Effect of 2, 4-D and BAP on In vitro regeneration of garlic. **OnLine Journal of Biological Sciences**, v.2, p.771-774, 2003.
- KAUSHAL, K. et al. Studies on somaclonal variation in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.662, p.269-275, 2004.
- KERBAUY, G. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: LUCINI, M.A. **O alho no Brasil: um pouco da história dos números do nobre roxo**. Curitiba: EPAGRI, 2008. 15p.
- LUCINI, M.A. **O alho no Brasil: um pouco da história dos números do nobre roxo**. Curitiba: EPAGRI, 2008. 15p.
- LUNELLO, P. et al. Yield Loss in Garlic Caused by Leek yellow stripe vírus Argentinean Isolate. **Plant Disease**, Saint Paul, v.91, p.153-158, 2007.
- MASUDA, K. et al. Micropropagation of garlic. **Bulletin Akita Prefecture College of Agriculture**, v.20, p.43-48, 1994.
- MATSUBARA, S.; CHEN, D. In vitro production of garlic plants and field acclimatization. **HortScience**, Alexandria, v.24, p.377-679, 1989.
- MELO FILHO, P.A. et al. Detection of three Allexivirus species infecting garlic in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, p.735-740, 2004.
- MUELLER, S. et al. Efeito da limpeza de vírus sobre a produtividade de alho em Caçador, SC. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.18, 2005.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- OLIVEIRA, C.M. et al. Harvest date and storage

- potential in garlic cultivars. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, p.804-807, 2004.
- OSAWA, K.; SUGAWARA, H. Studies on techniques of tissue culture: I. Experimento on the method of acclimatization of in vitro plantlets od vegetables (in Japanese). **Bulletin of Department Breeding Vegetables and Ornamental Crops**, v.7, p.22-25, 1980.
- PASQUAL, M. et al. **Aplicações na propagação de plantas**. Textos acadêmicos. In: Curso de Pós Graduação “Lato Sensu” (Especialização) a Distância – Cultura de Tecidos Vegetais. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001a. 81p.
- PASQUAL, M. et al. **Aplicações no melhoramento genético de plantas**. Textos acadêmicos. In: Curso de Pós Graduação “Lato Sensu” (Especialização) a Distância – Cultura de Tecidos Vegetais. Lavras:UFLA/FAEPE, 2001b. 79p.
- ROBERT, U. et al. Thermotherapy in vírus elimination from garlic: influences on shoot multiplicatin from meristems and bulb formtion in vitro. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.73, p.193-202, 1998.
- ROSSI, V. et al. Phenylurea derivatives for micropropagation of garlic meristems. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.394, p.263-271, 1995.
- SCOTTON, D. C. **Otimização do cultivo in vitro visando a transformação genética das cultivares brasileiras de alho (*Allium sativum* L.)**. 2007. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- SILVA, E.C. et al. Efeitos do tempo de frigorificação em cultivares de alho (*Allium sativum* L.) provenientes de cultura de meristemas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.939-946, 2000.
- SOUZA, R.J. et al. **Cultura do alho**. Textos Acadêmicos. Lavras: Ed. UFLA, 2002. 90p.
- TEIXEIRA, D.M.C. **Considerações sobre cultura de tecidos em alho**. ABCTP NOTÍCIAS n.23, 1996. Disponível em: http://www.cnph.embrapa.br/laborato/biocel/23_art2.htm Acesso: em 22 out. 2008.
- TORRES, A.C. et al. (ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 2v. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-Hortaliças, 1998. p.519-531.
- TORRES, A.C. et al. Shoot tip culture and thermotherapy for recovering vírus-free plants of garlic. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p.192-195, 2000.
- TORRES, A.C. et al. **Produção de alho-semente com alta qualidade fitossanitária mediante cultura de ápices caulinares**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2001. 8p. Circular Técnica, 27.
- YURI, J.E. et al. Vernalização do alho para o cultivo in vitro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, p.585-588, 2004.
- VERBEEK, M. et al. Efficiency of eradication of four viruses from garlic (*Allium sativum*) by meristem-tip culture. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.101, p.231-239, 1995.