

**IAC**  
**INSTITUTO AGRONÔMICO**  
**PÓS-GRADUAÇÃO**

**DISSERTAÇÃO**

**MICROPROPAGAÇÃO DE ALHO E GINOGÊNESE *IN***  
***VITRO* DE CEBOLA**

**ANA ELISA DE OLIVEIRA E LONGO**

**Campinas, SP**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**INSTITUTO AGRONÔMICO**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA  
TROPICAL E SUBTROPICAL**

**MICROPROPAGAÇÃO DE ALHO E GINOGÊNESE *IN*  
*VITRO* DE CEBOLA**

**ANA ELISA DE OLIVEIRA E LONGO**

**Orientador: Dr. Walter José Siqueira**  
**Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Ilene Ribeiro da Silva Passos**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia

Campinas, SP  
Abril 2009

Ficha elaborada pela bibliotecária do Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agrônômico

L856m Longo, Ana Elisa de Oliveira e  
de Micropropagação de alho e ginogênese *in vitro* de cebola / Ana Elisa  
Oliveira e Longo. Campinas, 2009. 130 fls.

Orientador: Walter José Siqueira  
Co-orientadora: Ilene Ribeiro da Silva Passos  
Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) - Instituto Agrônômico

1. *Allium*. 2. Micropropagação do alho 3. Cebola I. Siqueira, Walter José  
II. Passos, Ilene Ribeiro da Silva III. Título

CDD. 635.252

Aos meus pais, Beatriz e Antonio Carlos e a minha irmã Patrícia, pelo incansável estímulo, apoio, carinho e amor no desenvolvimento desta dissertação.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

- Ao orientador Dr. Walter José Siqueira (IAC), pela confiança, dedicação, amizade e pelos muitos ensinamentos na realização desta dissertação;
- À co-orientadora Dra. Ilene Ribeiro da Silva Passos (IAC), por tantos ensinamentos transmitidos, auxílio, amizade, dedicação e atenção dispensada para a realização desta dissertação;
- À empresa SAKATA pelo crédito e concessão de bolsa de mestrado;
- À pesquisadora Olga Satie Suzuki (SAKATA), pela ajuda, confiança, pelo apoio e ensinamentos transmitidos na realização desta dissertação;
- Ao pesquisador Cícero Beserra de Menezes (SAKATA), por fornecer o material vegetal, pelo crédito, ajuda e ensinamentos transmitidos para o desenvolvimento desta dissertação;
- Ao pesquisador Rômulo Kobori (SAKATA), pelo grande incentivo, confiança, apoio e ajuda na realização desta dissertação;
- À pesquisadora Dra. Marta Dias Scott (IAC), pela colaboração, sugestões, suporte, auxílio, amizade, apoio e ajuda na realização desta dissertação;
- À técnica de laboratório Raully Máximo Rabello Moretti (IAC), pela amizade, ajuda, e fundamentais ensinamentos no laboratório de Cultura de Tecidos ao longo dos anos;
- À pesquisadora Dra. Haiko Enok Sawazaki (IAC), pela ajuda, atenção e colaboração no laboratório de Biologia Molecular para a realização desta dissertação;
- Ao professor e pesquisador Dr. Carlos Augusto Colombo (IAC), pela amizade, ensinamentos e sugestões na realização desta dissertação;
- Aos membros da banca Dra. Daniela de Argollo Marques (IAC) e ao Dr. José Pinheiro Baldin (ESALQ) pelas valiosas sugestões;
- Aos pesquisadores em especial Dr. José Alfredo Usberti Filho e Dr. Ademar Espironello (IAC) além de outros pela amizade, carinho e estímulo ao longo dos anos;
- A minha família, meus pais Beatriz e Antônio Carlos e minha irmã Patrícia por sempre acreditarem em mim, pela paciência, amor e carinho e por me darem todo suporte e apoio para o desenvolvimento e conclusão desta dissertação;
- Ao amigo e companheiro André, pelo carinho, apoio, incentivo, amizade e muita paciência em todos os momentos;
- Aos amigos Fernanda, Liamar, Francine, Juliana, Matheus, Marcos, Fabrício e colegas de pós- graduação pelos momentos de descontração e ajuda;

- Às amigas Mônica e Carol, que mesmo distantes sempre me apoiaram, incentivaram e compreenderam;
- Aos professores da pós-graduação pelos ensinamentos e grande contribuição para minha formação;
- Aos estagiários e amigos dos laboratórios de Cultura de Tecidos, Citogenética e Biologia Molecular (IAC) ao longo dos anos;
- Aos funcionários Iracema, Solange, Rita, Luísa e Zé, da Seção de Recursos Genéticos Vegetais (IAC), pela amizade a ajuda, confiança, ao longo dos anos;
- Aos funcionários da PG-IAC, pelo auxílio, prontidão e descontração no decorrer do curso;
- A todos que colaboraram para realização e finalização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1 Aspectos Gerais da Cultura de Alho.....	04
2.2 Cultura de Tecidos em Alho.....	08
2.3 Aspectos Gerais da Cultura da Cebola.....	11
2.4 Bulbificação e Florescimento de Cebola.....	13
2.5 Produção de Cultivares Híbridos e de Polinização Aberta.....	15
2.6 Melhoramento Genético da Cebola e Macho-esterilidade Genético-Citoplasmática.....	17
2.7 Obtenção de Linhas Duplo-haplóides.....	19
2.8 Cultura <i>in vitro</i> de Gametófitos Femininos e/ou Masculinos Para a Produção de Haplóides.....	20
2.9 Ginogênese <i>In Vitro</i> em Cebola.....	22
2.10 Fatores que Influenciam a Ginogênese em Cebola.....	25
2.11 Ploidia de Plantas Ginogênicas de Cebola.....	29
2.12 Micropropagação e Bulbificação em Cebola.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Micropropagação e Bulbificação de Alho.....	33
3.1.1 Material vegetal.....	33
3.1.2 Assepsia do material (dentes).....	33
3.1.3 Isolamento e cultivo dos explantes meristemáticos.....	34
3.1.4 Efeito de diferentes concentrações de 6-BA e de elevada dose de sacarose na micropropagação e bulbificação do alho.....	34
3.1.5 Efeito da interação entre 6-BA e KIN na micropropagação de alho.....	35
3.1.6 Efeito de diferentes níveis de sacarose na bulbificação <i>in vitro</i> de alho.....	35

3.1.7 Efeito de diferentes níveis de sacarose e nitrogênio total na bulbificação <i>in vitro</i> .....	35
3.1.8 Análises estatísticas.....	36
3.2 Ginogênese <i>In Vitro</i> de Cebola.....	37
3.2.1 Material vegetal.....	37
3.2.2 Cultura de botões florais.....	37
3.2.2.1 Influência do genótipo, estágio de desenvolvimento dos botões florais e meios de indução MI1 e MI2 na regeneração <i>in vitro</i> .....	37
3.2.2.2 Efeito de genótipo, tamanho de botões florais, meios de indução e tempo de exposição no meio de indução na regeneração <i>in vitro</i> .....	39
3.2.3 Análise cromossômica.....	40
3.2.4 Análise com isoenzimas.....	41
3.2.5 Cultura de óvulos.....	42
3.3 Micropropagação e Bulbificação <i>In Vitro</i> de Cebola.....	44
3.3.1 Micropropagação <i>in vitro</i> .....	44
3.3.2 Bulbificação <i>in vitro</i> .....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1 Micropropagação e Bulbificação de Alho.....	48
4.1.1 Efeito de diferentes concentrações de 6-BA e de elevada dose de sacarose na micropropagação e bulbificação do alho.....	48
4.1.2 Efeito da interação entre 6-BA e KIN na micropropagação de alho.....	52
4.1.3 Efeito de diferentes níveis de sacarose na bulbificação <i>in vitro</i> de alho.....	58
4.1.4 Efeito de diferentes níveis de sacarose e nitrogênio total na bulbificação <i>in vitro</i> .....	64
4.2 Ginogênese <i>In Vitro</i> de Cebola.....	71
4.2.1 Cultura de botões florais.....	71
4.2.1.1 Influência do genótipo, estágio de desenvolvimento dos botões e meios de indução MI1 e MI2 na regeneração <i>in vitro</i> .....	71
4.2.1.2 Efeito de genótipo, tamanho dos botões florais, meios de indução e tempo de exposição no meio de indução na regeneração <i>in vitro</i> .....	74
4.2.2 Análise cromossômica.....	79
4.2.3 Análise com isoenzimas.....	82
4.2.4 Cultura de óvulos.....	84

4.3 Micropropagação e Bulbificação <i>In Vitro</i> de Cebola.....	101
4.3.1 Micropropagação <i>in vitro</i> .....	101
4.3.2 Bulbificação <i>in vitro</i> .....	104
4.4 Considerações Finais em Ambas Espécies.....	105
4.4.1 Micropropagação e bulbificação <i>in vitro</i> de alho.....	105
4.4.2 Ginogênese <i>in vitro</i> de cebola.....	106
4.4.3 Micropropagação e bulbificação <i>in vitro</i> de cebola.....	107
5 CONCLUSÕES.....	109
5.1 Micropropagação e Bulbificação <i>in vitro</i> de Alho.....	109
5.2 Ginogênese <i>in vitro</i> de Cebola.....	109
5.3 Micropropagação e Bulbificação <i>In Vitro</i> de Cebola.....	110
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
7 ANEXOS.....	123
7.1 Anexo 1.....	123
7.2 Anexo 2.....	127
7.2.1 Meio B5.....	127
7.2.2 Meio MS.....	128
7.3 Anexo 3.....	130

## LISTA DE ABREVIações

HQ - hidroxiquinolina

MS ou MS - Meio de cultura de Murashige & Skoog (1962)

½ MS - Meio de Murashige e Skoog na metade das concentrações de sais, vitaminas, e, quando não especificado, de sacarose

2,4-D - Ácido 2,4 – Diclorofenoxiacético

6-BA - 6-Benzilaminopurina

B5 - Meio de cultura de Gamborg et al. (1968)

2-ip - isopentenyladenina,

AIB - ácido indol butílico

NAA - ácido naftalenoacético

KIN - N6-furfuryladenina

GA<sub>3</sub> - ácido giberélico

IAA – ácido indol acético

TIBA – ácido triiodobenzóico

PA - Poliaminas

N – Nitrogênio

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> - Nitrato de amônia

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - Amônia

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - Nitrato

APM - amiprofos-methyl

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 –	Evolução dos estudos no processo de ginogênese <i>in vitro</i> de cebola ao longo dos anos.....	25
Tabela 2 -	Médias das características avaliadas em cinco meios de cultura, variando a concentração (doses em $\mu\text{M}$ ) do fitorregulador 6-BA, com posterior transferência para sacarose ( $60 \text{ g.L}^{-1}$ ).....	48
Tabela 3 -	Porcentagem de bulbificação e de chochamento de bulbinhos em cinco concentrações de 6-BA ( $\mu\text{M}$ ) seguida de transferência para meio com sacarose.....	52
Tabela 4 -	Médias de comprimento de planta para 25 diferentes tratamentos em dialélico envolvendo cinco concentrações de duas citocininas: KIN ( $\mu\text{M}$ ) e 6-BA ( $\mu\text{M}$ ).....	54
Tabela 5 -	Médias das características avaliadas (razão bulbar, massa fresca e seca (g) e perda de água (%) de bulbinhos) para cinco diferentes tratamentos variando a concentração de sacarose no meio de cultura visando à bulbificação <i>in vitro</i> .....	58
Tabela 6 -	Resultados da taxa de bulbificação de plantas e da taxa de chochamento de bulbinhos após a cura de 40 dias sob condição ambiente.....	62
Tabela 7 -	Médias das características avaliadas para massa de bulbinho (g), escala de notas (1 a 4) para intensidade de necrose e coloração da parte aérea (folhas) e massa seca de folha de bulbinho (g) em meios de cultura com variação da concentração do meio MS, de sacarose e de nitrogênio.....	65
Tabela 8 -	Porcentagem de plantas que bulbificaram (%) e chochamento de bulbinhos obtidos (%) após a cura de 35 dias em condições ambiente.....	70

Tabela 9 -	Número absoluto de botões florais que não contaminaram (viáveis) obtidos para cada estágio de explante e tempo nos meios de indução de ginogênese de cebola: MI1 – B-5 com 2,0 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L <sup>-1</sup> de 6-BA, suplementado com 75 g.L <sup>-1</sup> de sacarose e MI3, mesmo meio de indução MI1, porém suplementado com 500 mg.L <sup>-1</sup> de espermina.....	74
Tabela 10 -	Porcentagem de regeneração de plantas de cebola para cada tipo de explante (botão floral) e o estágio de desenvolvimento da umbela (planta matriz) de que o explante foi retirado.....	75
Tabela 11 -	Porcentagem de regeneração de plantas a partir de botões florais de cebola nos diferentes períodos de tempo em que permaneceram nos meios de indução MI1: B-5 com 2,0 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L <sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75g.L <sup>-1</sup> de sacarose e 5,8g.L <sup>-1</sup> de ágar e MI3, mesmo meio de indução MI1, porém suplementado com 500 mg.L <sup>-1</sup> de espermina. Considerando-se todos os 15 genótipos testados e todos os estágios de botões (grandes, médios e pequenos).....	76
Tabela 12 -	Porcentagem de plantas de cebola regeneradas a partir de botões florais que foram inoculados em meio de indução MI1: B-5 com 2,0mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0mg.L <sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75g.L <sup>-1</sup> de sacarose e 5,8g.L <sup>-1</sup> de ágar e MI3, mesmo meio de indução MI1, porém suplementado com 500 mg.L <sup>-1</sup> de espermina, considerando-se todos os diferentes períodos de tempo (7, 14, 21, 45 e controle contínuo) em que permaneceram em meio de indução para cada genótipo em particular.....	77
Tabela 13 -	Resumo das plantas regeneradas <i>in vitro</i> a partir de botões florais inoculados e mantidos nos meios de indução (MI1 e MI3) por diferentes períodos de tempo (tempo de exposição - dias) no ano de 2007.....	78
Tabela 14 -	Número de cromossomos de cada planta regenerada nos estágios de umbelas, tamanhos de botões florais, dias em meio de indução e genótipos.....	80

Tabela 15 - Resultado da análise isoenzimática para as duas plantas regeneradas a partir de botões florais que foram analisadas, tipos de explantes, dias em meio de indução e genótipos.....	83
Tabela 16 - Número de óvulos (explantes) viáveis (sem contaminação), juntando-se os meios utilizados, para cada genótipo e tamanho de botão floral.....	85
Tabela 17 - Quantidade de óvulos viáveis inoculados em cada meio (A e B), na presença e na ausência total de luz, para cada genótipo, quantidade de calos, regenerações via calos (embriogênese indireta) e embriões diretos obtidos.....	87
Tabela 18 - Quantidade de óvulos viáveis inoculados em cada meio (C, D e E), na presença e na ausência total de luz, para cada genótipo; quantidade de calos, regenerações via calos (embriogênese indireta) e embriões diretos obtidos.....	88
Tabela 19 - Quantidade de óvulos viáveis inoculados em cada meio (F, G, H e I), na ausência total de luz, para cada genótipo; quantidade de calos, regenerações via calos (embriogênese indireta) e embriões diretos obtidos.....	89
Tabela 20 - Resultado de explantes inoculados e contaminados em cada meio de cultura (MS1, MS2 e MS3), para cada genótipo, tipo de explante e desinfecção testadas.....	101
Tabela 21 - Resultado de explantes inoculados e contaminados em cada meio de cultura (MSa, MSb; MSc; MSd; MSe; e MSf), para cada genótipo e desinfecção testadas.....	103
Tabela 22 - Quantidade de plantas inoculadas nos meios de bulbificação (MSA, MSB, MSC, MSD) que bulbificaram para cada genótipo.....	104

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema dos diferentes tipos de explantes obtidos de discos basais de bulbos (A, B) e bulbinhos (C) de cebola.....	46
Figura 2 -	Valores de comprimento de folha (cm) observados e pela regressão para as concentrações (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 $\mu$ M) de 6-BA testadas visando ao crescimento de ápices caulinares.....	50
Figura 3 -	Valores de massa fresca de folha (g) observados e pela regressão para as concentrações (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 $\mu$ M) de 6-BA testadas visando ao crescimento de ápices caulinares.....	50
Figura 4 -	Valores de massa seca de bulbinhos (g) observados e pela regressão para as concentrações (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 $\mu$ M) de 6-BA testadas visando ao crescimento de ápice caulinar, após transferência para meio de bulbificação.....	51
Figura 5 -	Comprimento de planta observado para cada combinação de KIN e 6-BA: T1 (0;0); T2 (0;15); T3 (0;20); T4 (0;25); T5 (0;30); T6 (5;0); T7 (5;15); T8 (5;20); T9 (5;25); T10 (5;30); T11 (10;0); T12(10;15); T13 (10;20); T14 (10;25); T15 (10;30); T16 (15;0); T17 (15;15); T18 (15;20); T19 (15;25); T20 (15;30); T21 (20;0); T22 (20;15); T23 (20;20); T24 (20;25); T25 (20;30).....	55
Figura 6 -	Valores de comprimento de planta (cm) observados e regressões estimadas (6a-6j) dentro de cada concentração (desdobramentos de graus de liberdade da análise de variância) para o dialélico com (0,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 $\mu$ M de 6-BA) X (0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 $\mu$ M de KIN).....	57
Figura 7 -	Valores de razão bulbar observada e pela regressão linear para as cinco concentrações de sacarose testadas. Razão bulbar: diâmetro do pseudocaulo dividido pelo diâmetro maior do bulbinho.....	59

Figura 8 -	Cultura de ápices caulinares de alho, clone IAC 19: a) e b) Estádios iniciais em meio de crescimento MS completo acrescido com 5,0 $\mu$ M de KIN e 0,0 de 6-BA do tratamento T6; c) Planta em meio MS completo suplementado com 60 $\text{g.L}^{-1}$ de sacarose e sem fitorreguladores com formação de bulbinho de alto valor de razão bulbar $\geq 0,5$ (bulbinho mal formado com a base do pseudocaule emitindo folhas novas); d) Bulbinho de melhor conformação com razão bulbar $\leq 0,5$ em meio MS completo suplementado com 50 $\text{g.L}^{-1}$ de sacarose e sem fitorreguladores.....	61
Figura 9 -	Cultura de ápices caulinares de alho, clone IAC 19: a), b), c) Diferentes bulbinhos formados inicialmente em meios do dialélico 6-BA x KIN, seguido de transferência das plantas para meio com elevada concentração de sacarose. Os bulbinhos estão formados, mas a parte aérea não mostra senescência. d) Bulbinho de razão bulbar ideal, mas com emissão contínua de brotações contribuindo para o chochamento quando da retirada das condições <i>in vitro</i> e manutenção no ambiente.....	63
Figura 10 -	Formação de bulbo com toailete prévia das folhas externas mostrando a brotação nova do bulbo evidenciando a ausência de dormência das gemas vegetativas presentes na base do bulbo.....	64
Figura 11 -	Bulbinhos de alho da cultivar IAC-19, formados em meio de bulbificação MS completo, sem fitorreguladores, suplementado com 60 $\text{g.L}^{-1}$ de sacarose. Note-se bulbificação (setas) a partir de gemas laterais.....	67
Figura 12 -	Valores de massa seca (g) de folhas observados para os dez tratamentos testados com diferentes concentrações de MS, sacarose e nitrogênio para desenvolvimento de bulbos.....	68
Figura 13 -	Valores de notas (1 a 4) de intensidade de necrose e coloração da parte aérea (folhas) observados para os dez tratamentos testados com diferentes concentrações de MS, sacarose e nitrogênio para desenvolvimento de bulbos.....	68

Figura 14 - Valores de massa seca (g) de bulbinhos observados para os dez tratamentos testados com diferentes concentrações de MS, sacarose e nitrogênio para desenvolvimento de bulbos.....	69
Figura 15 - Taxa de calogênese em porcentagem obtida em três diferentes genótipos de cebola (1842; 2519; 2592) à partir de cultivo de botões florais de diferentes tamanhos: médios (0,014 g e/ou $\geq 4$ mm) e grandes (0,018 g e/ou $\geq 5$ mm) e em meios de indução: MI1 - B-5 suplementado com de 75 g.L <sup>-1</sup> de sacarose, com fitorreguladores e MI2 - B-5 suplementado com 30 g.L <sup>-1</sup> de sacarose, sem fitorreguladores.....	71
Figura 16 - Porcentagem de embriões formados em três diferentes genótipos de cebola (1842; 2519; 2592) à partir de cultivo de botões florais de diferentes tamanhos: médios (0,014 g e/ou $\geq 4$ mm) e grandes (0,018 g e/ou $\geq 5$ mm) e em meios de indução: MI1 - B-5 suplementado com de 75 g.L <sup>-1</sup> de sacarose, com fitorreguladores e MI2 - B-5 suplementado com 30 g.L <sup>-1</sup> de sacarose, sem fitorreguladores.....	72
Figura 17 - Número absoluto de plantas regeneradas, juntando-se tamanho de botões médios (0,014 g e/ou $\geq 4$ mm) e grandes (0,018 g e/ou $\geq 5$ mm) e meios de indução (MI1 e MI2), para cada um dos três genótipos testados (1842; 2519 e 2592).....	73
Figura 18 - Análise cromossômica da planta regenerada 2479 mostrando metáfase com 16 cromossomos.....	81
Figura 19 - Genótipo 2510, planta regenerada a partir de botão floral, aclimatada em vaso, mantida em casa de vegetação.....	82
Figura 20 - Análise isoenzimática. Planta 1 - genótipo 2510, regenerada a partir de botão floral; Planta 2 - genótipo 2753, regenerada a partir de botão floral. a) e c) sistema isoenzimático EST; b) e d) sistema isoenzimático GOT. Os círculos indicam as bandas das plantas regeneradas testadas mostrando os 2 alelos diferentes para um mesmo locus.....	84
Figura 21 - Óvulos de cebola em meio de cultura líquida (meio D) do genótipo 2753 com 20 dias de inoculação.....	85

Figura 22 -	Planta de cebola desenvolvida diretamente de um embrião de óvulo inoculado em meio A, isolado de uma umbela aberta, botão grande, genótipo 2592.....	86
Figura 23 -	Calos organogênicos com setores verdes e gemas incipientes (setas) e plantas regeneradas a partir de cultura de óvulos isolados (frascos à direita) de cebola.....	86
Figura 24 -	Detalhes de plantas regeneradas (embriogênese direta) a partir de células do saco embrionário de óvulos de cebola, sem a passagem por calos.....	86
Figura 25 -	Histogramas para a variável crescimento de óvulos, no meio de cultura A (B-5 com 2,0 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L <sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L <sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L <sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L <sup>-1</sup> de carvão ativado), tamanhos de botões (grandes, médios, pequenos) na ausência total de luminosidade para os genótipos 2592 e 2892-15.....	91
Figura 26 -	Histogramas para a variável crescimento de óvulos, nos meios de cultura (MEIO A: B-5 com 2,0 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L <sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L <sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L <sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L <sup>-1</sup> de carvão ativado; MEIO B: idem ao meio A sem carvão ativado), tamanhos de botões (grandes, médios, pequenos) e presença (16hs luz, 8hs escuro) ou ausência total de luminosidade para os genótipos 2831-1; 1824 e 2546.....	91
Figura 27 -	Histogramas para a variável crescimento de óvulos, para tamanhos de botões (grandes, médios, pequenos), presença (16hs luz, 8hs escuro) ou ausência total de luminosidade para o genótipo 2546 no MEIO E (idem ao A, com 5 g.L <sup>-1</sup> de carvão ativado ao invés de 2 g.L <sup>-1</sup> ) e genótipo 2753 no MEIO D (idem ao meio A, mas sem carvão ativado e sem ágar - meio líquido).....	92

- Figura 28 - Histogramas para a variável crescimento de óvulos nos meios de cultura MEIO A: B-5 com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado; MEIO B: idem ao meio A sem carvão ativado. MEIO F: B-5 com 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar, e o dobro de vitaminas (10ml de tiamina HCl, 1ml de piridoxina HCl e 1ml de ácido nicotínico); MEIO H: idem ao F, contendo 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup>; MEIO I: idem ao meio F, com 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup> tamanhos de botões (grandes, médios, pequenos), na ausência total de luminosidade para os genótipos 2831-4; 2856 e 2840..... 92
- Figura 29 - Histogramas para a variável porcentagem de calos em cebola, para o meio A (B-5 com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado), diferentes tamanho de botões (Grande, Médio, Pequeno), na ausência total de luz para os genótipos 2592 e 2892-15..... 94
- Figura 30 - Histogramas para a variável porcentagem de calos em cebola, meios em que os óvulos foram inoculados (MEIO A: B-5 com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado; MEIO B: idem ao meio A sem carvão ativado), diferentes tamanho de botões (G, M, P) e presença (16hs luz, 8hs escuro) ou ausência total de luz (L e E) para os genótipos 2831-1; 1824 e 2546..... 95
- Figura 31 - Histogramas para a variável porcentagem de calos em cebola, diferentes tamanho de botões (G, M, P), presença (16hs luz, 8hs escuro) ou ausência total de luminosidade para o genótipo 2753 no MEIO D (idem ao meio A, mas sem carvão ativado e sem ágar - meio líquido) e genótipo 2546 no MEIO E (idem ao A, com 5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado ao invés de 2 g.L<sup>-1</sup>)...... 96

Figura 32 - Histogramas para a variável porcentagem de calos em cebola, meios em que os óvulos foram inoculados MEIO A: B-5 com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado; MEIO B: idem ao meio A sem carvão ativado. MEIO F: B-5 com 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar, e o dobro de vitaminas (10ml de tiamina HCl, 1ml de piridoxina HCl e 1ml de ácido nicotínico); MEIO H: idem ao F, contendo 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup>; MEIO I: idem ao meio F, com 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup> tamanhos de botões (grandes, médios, pequenos), diferentes tamanho de botões (G, M, P) na ausência total de luz para os genótipos 2831-4; 2856 e 2840..... 97

Figura 33 - Explantes de discos basais inoculados em meio de cultura com início de desenvolvimento do genótipo 2778. a) e b) explante B em meio MS1; c) explante A em meio MS3 e d) explante A em meio MS2..... 102

## ÍNDICE ANEXOS

	7.1 Anexo 1 - Tabelas.....	123
Tabela 1 –	Material vegetal utilizado nos experiementos <i>in vitro</i> de cebola com as respectivas características individuais, de interesse ao programa de melhoramento genético fornecido pela empresa SAKATA SEED SUDAMERICA LTDA.....	123
Tabela 2 –	Protocolo utilizado para preparo do Gel para análise isoenzimática.....	124
Tabela 3 –	Protocolo utilizado para isoenzima Esterase (EST) (E.C. 3.1.1.1), para 50ml.....	125
Tabela 4 –	Protocolo utilizado para isoenzima Glutamato Oxaloacetato Transaminase (GOT) (E.C. 2.6.1.1), para 20ml.....	125
Tabela 5 –	Protocolo utilizado para isoenzima Malato Desidrogenase (MDH) (E.C.1.1.1.37), para 50ml.....	125
Tabela 6 –	Protocolo utilizado para isoenzima Glucose-6-fosfato Deshidrogenase (G <sub>6</sub> PD) (E.C 1.1.1.44), para 50ml.....	126
	7.2 Anexo 2 - Meios de Cultura.....	127
7.2.1	Meio B-5 (Gamborg et al. 1968) para 1L.....	127
Tabela 7 –	Quantidades de macronutrientes a serem pesados para preparo do meio B5.....	127
Tabela 8 –	Quantidades de vitaminas a serem pipetadas para preparo do meio B5.....	127
Tabela 9 –	Quantidades de substâncias orgânicas a serem pesadas para preparo do meio B5.....	128
	7.2.2 Meio MS (Murashige & Skoog, 1962) para 1L.....	128
Tabela 10 –	Quantidades de macronutrientes a serem pesados para preparo do meio MS.....	128
Tabela 11 –	Quantidades de vitaminas a serem pipetadas para preparo do meio MS.....	129
Tabela 12 –	Quantidades de substâncias orgânicas a serem pesadas para preparo do meio MS.....	129
	7.3 Anexo 3 - Figuras.....	130

Figura 1 -	Planta de alho bem desenvolvida com presença de raízes em meio de bulbificação com 30g.L <sup>-1</sup> de sacarose sem a formação de bulbinho.....	130
Figura 2 -	Óvulos de cebola; a) Vista de topo mostrando forma esférica e sem formação de massa embrionária no interior; b) vista lateral mostrando formato alongado e também sem formação de massa embrionária; c) óvulo (direita) em corte transversal com nítida formação interna de massa celular ou embrião (seta).....	130

LONGO, Ana Elisa de Oliveira e. **Micropropagação de Alho e Ginogênese *In Vitro* de Cebola**. 2009. 130f. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Pós-Graduação – IAC.

## RESUMO

Dentre as hortaliças cultivadas no Brasil, duas espécies do gênero *Allium*, o alho e a cebola, ocupam posição de destaque tanto econômico quanto social. Por isso, programas de melhoramento genético incluindo ferramentas biotecnológicas são importantes para o desenvolvimento de novas cultivares adaptadas às condições brasileiras de solo e clima. O alho é uma espécie de propagação vegetativa, por isso o melhoramento genético se baseia em métodos que aumentem a variabilidade genética, como mutações, variação somaclonal e outros métodos de cultura de tecidos, bem como engenharia genética. Protocolos eficientes de crescimento de ápices caulinares e posterior bulbificação *in vitro* são importantes para limpeza clonal e manutenção da fidelidade genética. Já a cebola é uma planta alógama, de ciclo bienal, que apresenta baixa taxa de autofecundação. A indução de haplóides via ginogênese *in vitro* tem grande potencial por acelerar a produção de linhas homozigotas, que são de extremo interesse para a produção comercial de híbridos F<sub>1</sub>. Os objetivos desta dissertação foram: 1) estudar as combinações de meios de cultura *in vitro* para micropropagação e bulbificação de alho; 2) induzir haplóides via ginogênese *in vitro* de cebola; e 3) estudar a micropropagação e bulbificação de cebola. Para crescimento de ápices caulinares de alho, foram testadas diferentes concentrações de 6-BA, sozinho, ou em combinação com cinetina. Na bulbificação foram testados meios com diferentes concentrações de sacarose, sais de MS e nitrogênio. Para indução de ginogênese *in vitro* de cebola foram utilizados inicialmente botões florais e testados diferentes meios de indução com ou sem fitorreguladores e concentrações de sacarose, além de diferentes tempos de indução. Foram feitas análises cromossômicas para constatar a ploidia e análises isoenzimáticas visando diferenciar plantas heterozigotas de homozigotas. Posteriormente foram utilizados óvulos, testando-se meios com presença ou ausência de carvão ativado, diferentes concentrações de fitorreguladores e sacarose, sob presença ou ausência total de luminosidade. Para micropropagação de cebola a partir de discos basais foram testadas 8 desinfecções em meios com diferentes concentrações de 6-BA e NAA. Para bulbificação, foram testados meios com diferentes concentrações de sacarose. Os resultados evidenciaram que a melhor concentração de 6-BA para crescimento de ápices

caulinares de alho foi 5 $\mu$ M, pois nesta concentração houve aumento da massa fresca dos bulbilhos. O estudo constatou interação entre as citocininas 6-BA e KIN para comprimento de planta. Pode ser usada tanto essa combinação quanto 6-BA, isolado. Para aumento de massa de bulbinho com senescência de folhas na bulbificação em alho, deve-se aumentar a concentração de sacarose, fornecer nutrientes pelo meio MS, mas retirar os compostos nitrogenados. Os experimentos de ginogênese *in vitro* de cebola utilizando-se botões florais mostraram alta contaminação e hiper-hidricidade e 0,142% de regeneração. As análises cromossômicas e isoenzimáticas mostraram que as plantas regeneradas eram diplóides e heterozigotas. Os experimentos utilizando-se óvulos mostraram baixa contaminação, 0,106% de plantas regeneradas e 10,52% de calos com potencial para regeneração. O experimento de micropropagação e bulbificação em cebola teve alta taxa de contaminação, ficando sem repetibilidade, mas mostrou que todas as combinações testadas que não contaminaram regeneraram plantas e bulbificaram.

**Palavras-chave:** *Allium*, ápices caulinares, duplo-haplóides, bulbificação.

LONGO, Ana Elisa de Oliveira e. **Micropropagation of garlic and *in vitro* onion gynogenesis**. 2009. 130p. Dissertation (Master Program in Genetics, Plant Breeding and Biotechnology) – Postgraduate – IAC.

#### ABSTRACT

Among the vegetables that are cultivated in Brazil, two species of the genus *Allium*, garlic and onion, are economically and socially relevant. Because of that, genetic breeding programs including biotechnological tools are important for the development of new cultivars that are well adapted to Brazilian water and soil conditions. Garlic is a vegetatively propagated species, so its genetic improvement is based on methods that improve genetic variability, such as mutations, somaclonal variation and other tissue culture methods, as well as on genetic engineering. Efficient protocols for the development of meristematic apices and subsequent *in vitro* bulbing are important for obtaining virus-free clones and for the preservation of genetic identity. Onion is an allogamic plant, with biennial flowering cycle and low inbreeding rates. Thus, induction of haploid plants through *in vitro* gynogenesis has great potential for accelerating the production of homozygous lines, which are interesting for commercial breeding of F<sub>1</sub> hybrids. The objectives of this dissertation were: 1) to study combinations of *in vitro* culture media for garlic micropagation and bulbing; 2) to induce haploid plants through *in vitro* onion gynogenesis; and 3) to study micropropagation and bulbing in onion. Different concentrations of BAP, as well as combinations of BAP and KIN, were tested for the development of garlic meristematic apices. For bulbing, media with different concentrations of sucrose, MS and nitrogen were tested. For *in vitro* onion gynogenesis induction, flower buds were initially used, and different induction media, with or without phytohormones and sucrose concentrations as well as different induction times were tested. In order to verify ploidy levels and to distinguish heterozygous from homozygous plants, chromosomal and isozymatic analyses were conducted. Subsequent experiments with ovules tested media with or without activated charcoal and different sucrose and phytohormone concentrations, in light or total darkness conditions. Eight sterilization tests, in different BAP and NAA concentration media, were conducted for onion propagation from basal plates. For bulbing, different sucrose concentration media were tested. Results showed that the best concentration of BAP for the development of meristematic garlic apices was 5µM, which led to the increase in bulblet fresh matter. The study showed interaction between BAP and KIN for length of the plant. However,

BAP can be used alone with the same results. In order to increase bulblet fresh matter with leaf senescence in bulbing, sucrose concentration should be increased, and nutrients should be provided through MS medium, but nitrogenic compounds should be excluded. Onion *in vitro* gynogenesis experiments with flower buds led to high rates of contamination and hyperhydricity, and 0.142% of regeneration. Chromosomal and isozymatic analyses showed that regenerants were diploid and heterozygous. Experiments with ovules showed low rates of contamination, 0.106% of regenerated plants and 10.52% calli with regenerating potential. Micropapagation and bulbing experiments in onion led to high contamination rates, thus preventing repeatability, but media combinations that did not contaminate regenerated plants and induced bulbing.

**Key Words:** *Allium*, meristematic apices, double haploids, bulbing.

## 1 INTRODUÇÃO

Devido a suas características acentuadas de aroma e sabor, o alho (*Allium sativum* L.) e a cebola (*Allium cepa* L.) têm posição de destaque como condimento de consumo *in natura* em todo o mundo. A cebola é a terceira hortaliça em importância econômica no Brasil, sendo superada apenas pela batata e pelo tomate. O alho é uma das hortaliças de maior relevância econômica e social no Brasil, sendo cultivado principalmente por pequenos agricultores.

O estresse ambiental, a incidência de doenças e a utilização de cultivares não adaptadas aos sistemas de cultivo são as causas que mais contribuem para a baixa produtividade nacional de cebola e alho. O Brasil é, atualmente, muito carente em novas cultivares disponíveis aos produtores e são poucos os programas de melhoramento para as duas hortaliças.

O Brasil produz, atualmente, cerca de 60% do alho que consome e importa o restante. Embora a produção tenha aumentado na última década, os rendimentos médios das lavouras ainda são baixos. Naturalmente, fatores como clima e solo concorrem para essa variação, mas a questão está mais relacionada às cultivares plantadas e às técnicas de cultivo diferenciadas (MENEZES SOBRINHO, 1997), destacando-se a baixa tecnologia que, muitas vezes, é adotada do plantio à colheita do alho. O mercado consumidor prefere alhos do tipo nobre e seminobre que competem no mercado com as cultivares importadas.

Da mesma forma, os produtores de cebola procuram por um produto com maior competitividade em qualidade, custos e preços, optando assim, por cultivares que garantam maior produtividade, apresentem maior grau de resistência às doenças e que exibam padrão comercial similar ao do produto importado, especialmente quanto à uniformidade no tamanho do bulbo, cor, retenção de escamas e sabor. Estas preferências incluem cultivares de polinização aberta ou híbridos que proporcionem uma colheita uniforme, exatamente dentro da época programada (VILELA et al., 2002). Os poucos híbridos plantados no Brasil são importados e se adaptam a uma área muito restrita do território. O desenvolvimento de híbridos de cebola a partir de germoplasma nacional é uma necessidade urgente para contribuir para a elevação da produtividade. O tempo para obtenção de híbridos de cebola é de 15 a 20 anos, devido a um ciclo sementeiramente da cultura levar dois anos. Para reduzir os custos da produção de sementes

híbridas, a utilização de macho-esterilidade é a forma mais difundida entre as empresas produtoras de sementes, dentro e fora do país.

Já o alho é uma planta que se propaga predominantemente por via assexuada, e apenas em alguns clones da região de origem há ocorrência de sementes férteis. Este tipo de multiplicação é muito moroso e implica no uso de um elevado número de bulbilhos para propagar a cultura no campo, onde podem surgir diversos tipos de doenças e outros danos mecânicos (PEIWEN et al., 2000).

Combinar genótipos é um desafio para os melhoristas de alho. Por via sexual isso é impossível, então a alternativa seria a engenharia genética (via somática). A cultura de células e tecidos *in vitro* é uma alternativa usada para a sua multiplicação vegetativa, com a vantagem da obtenção de plantas isentas de micro-organismos por cultura de meristemas. Além disso, a microbulbificação *in vitro* permite a transferência para terra de plantas provenientes da cultura de meristemas sem perdas pelo processo de aclimatação, bastante drástico em outras espécies que não possuem estas estruturas reprodutivas.

No caso da cebola, o longo ciclo da espécie, e a baixa variabilidade genética das linhas A (macho-estéril-MS) e B (linha mantenedora) têm limitado a obtenção de híbridos no Brasil. Utilizando-se a técnica da cultura de tecidos vegetais, especialmente a cultura *in vitro* de óvulos, ovários ou botões florais de cebola, é possível reduzir o tempo de obtenção de linhas “C” (polinizadoras) homozigotas, criar variabilidade e desenvolver novas variedades. A indução de plantas haplóides ou duplo-haplóides a partir da cultura de óvulos (ginogênese) oferece ao melhoramento convencional a possibilidade de obter linhas puras, derivadas de óvulos oriundos de plantas da geração F<sub>1</sub> ou F<sub>2</sub>.

Visando à aplicação das biotecnologias apropriadas ao melhoramento genético de cada espécie estudada, os objetivos deste trabalho foram:

Alho:

a) estudar o efeito da citocinina 6-BA isolada ou em combinação com cinetina, na taxa de multiplicação de plantas de alho a partir de cultura de ápices meristemáticos caulinares;

b) estudar o efeito de concentrações de sacarose e combinações de nitrogênio e sacarose na bulbificação *in vitro*, da cultivar Lavínia.

Cebola:

- c) desenvolver metodologia para obtenção de plantas haplóides e/ou duplo-haplóides, por meio da ginogênese *in vitro*;
- d) micropropagar plantas de cebola a partir de cultura de discos basais;
- e) estudar o efeito de concentrações de sacarose na bulbificação *in vitro*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos Gerais da Cultura de Alho

O *Allium sativum* L. (alho) é uma planta herbácea originária da Ásia Central, que normalmente alcança quarenta a sessenta centímetros de altura, dependendo da cultivar plantada. Possui folhas lanceoladas, com o limbo medindo de 0,20 a 0,30 m de comprimento. O pseudocaulé é formado pela bainha das folhas, as quais se implantam em um caule pequeno e achatado (disco ou cilindro central). É uma espécie diplóide ( $2n=16$ ), anual e monocotiledônea, com planta do tipo herbácea, cujo órgão de armazenamento, classificado como bulbo, é a parte comercial (DUSI, 1995; MENEZES SOBRINHO, 1997). Devido a suas características acentuadas de aroma e sabor, o alho, *Allium sativum* L., tem posição de destaque como condimento de consumo *in natura* em todo o mundo. Sob condições climáticas favoráveis, as gemas do caule (meristemas) desenvolvem-se formando, cada uma, um bulbilho ou dente. Em seu conjunto, os bulbilhos formam o bulbo. O bulbo é arredondado, às vezes levemente periforme, e constituído de 5 a 56 bulbilhos, às vezes mais. Estes últimos têm, geralmente, morfologia ovóide-arqueada, algo falciforme, sendo envoltos por duas (raramente uma ou mais de duas) folhas protetoras (brácteas), brancas ou arroxeadas. Os bulbilhos estão ligados ao caule pela base, sendo recobertos por várias brácteas que, em seu conjunto, constituem a capa (túnica). A capa é delgada, branca ou arroxeadas. Na porção basal do caule verdadeiro localizado abaixo do solo, sendo um disco achatado, situado na extremidade inferior do bulbo, situa-se o sistema radicular. As raízes formam um sistema do tipo fasciculado, atingindo profundidades desde 40 até 80 cm. As folhas são emitidas na parte superior do caule, variando de estreitas a largas, podendo na superfície apresentar-se lisa ou com maior cerosidade. O escapo floral, quando presente, tem sua origem no centro do bulbo (JONES & MANN, 1963; MENEZES SOBRINHO, 1978).

O alho é uma espécie que, para bulbificar, necessita de dias longos e crescentes no terço final do ciclo para desenvolvimento, maturação dos bulbos e, por fim, para realizar a colheita após a senescência das plantas. Entretanto, no início do ciclo há necessidade de temperaturas amenas e disponibilidade de nutrientes para a fase juvenil, que é de pleno crescimento vegetativo. No meio do ciclo (após cerca de dois meses) há necessidade de um período de frio (pelo menos um mês) para quebra da dormência dos

meristemas localizados na base da planta (disco ou prato basal) na inserção das folhas, para indução do processo de bulbificação (LISBÃO et al., 1993; MENEZES SOBRINHO, 1997). Este estímulo de frio está relacionado com mudanças de balanços hormonais endógenos (FERREIRA et al., 1986 e CARVALHO et al. 1980) que resultam na mudança de rota dos meristemas de desenvolvimento de folhas expandidas para folhas de reserva (futuros bulbilhos ou dentes) onde serão acumulados os foto-assimilados com o aumento gradual da temperatura e fotoperíodo (MANN, 1952 e Mc COLLUM, 1976).

De acordo com a qualidade do bulbo, principalmente número de bulbilhos, o alho é classificado em três grupos. O alho nobre possui de 8 a 14 dentes de película roxa ou avermelhada (característica exigida pelo consumidor), regularmente inseridos no bulbo (não encavalados) e a túnica externa ou pele dos bulbos é branca. As cultivares (Caxiense, Chonan, Contestado, Quitéria, Roxo Pérola de Caçador ou simplesmente Caçador e Tupamaro) são vernalizadas, isto é, o bulbo fica em câmara frigorífica para indução de bulbificação em latitudes próximas do equador (SIQUEIRA et al., 1985). São mais exigentes em fotoperíodo (período que a planta necessita de exposição à luz para bulbificação, que normalmente é de 16h na luz e oito no escuro; neste caso mais de 16h de luz) e frio para a bulbificação (ciclo tardio na região de origem – Ásia Central) e, portanto, mais adaptados ao Sul do país. Estes alhos precisam de horas de frio adicionais (ainda nos bulbos ou dentes) para redução do mínimo crítico de horas de luz para entrar em indução da bulbificação nas condições não sulinas do país, o que confere maior custo à produção (LISBÃO et al., 1993). Porém, apesar da grande exigência em fotoperíodo, ou seja, precisam de mais horas na luz e mais frio para bulbificarem, essas cultivares são as que competem no mercado com as importadas do Chile, Argentina, México, Espanha e EUA (SIQUEIRA et al., 1985; LISBÃO et al., 1993).

As cultivares de ciclo médio menos exigentes em fotoperíodo (mínimo crítico indutivo menor), que possuem até 18 dentes, portanto, sem os chamados palitos (dentes pequenos e afilados), foram classificadas como seminobres. Os principais representantes desse grupo são: Lavínia e seleções, Amarante, Gigante Roxo, Roxinho, Peruano, Gigante Inconfidente, Gigante Curitibanos, Mendonça, Roxo de Arantes, Gigante de Tietê, Chinês, etc. Possuem bulbos arroxeados, ovalados, com dentes “encavalados”, portanto de inserção irregular dos bulbilhos, de película arroxeadas. São

comerciais por apresentarem dentes graúdos, porém o aspecto geral é inferior aos vernalizados e importados (SIQUEIRA et al., 1985).

No terceiro grupo, encontram-se as cultivares com número grande de dentes pequenos, depreciadas no comércio. Ficam neste grupo, denominado de comum, os alhos precoces (Gravatá, Branco Mineiro, Cajuru, Canela de Ema, Mineiro, etc), que são pouco ou não exigentes em fotoperíodo, necessitando apenas de um período frio no meio do ciclo para bulbificação. Como são precoces, os bulbos são pequenos (número de dentes > 25 por bulbo), comparativamente aos seminobres e nobres (estes quando tecnicamente bem produzidos), e com rejeição maior no comércio. Compõem também este grupo os alhos tardios, como o Centenário, Caiano, Barbado, etc, (> 30 dentes por bulbo) que apesar de apresentarem bulbos brancos de boa conformação têm a presença de palitos (dentes pequenos e afilados) e os do tipo Cateto (Cateto Roxo) que são de ciclo médio, mas também com elevado número de bulbilhos também sem expressão comercial (LISBÃO et al., 1993).

O mercado consumidor prefere alhos do tipo nobre e seminobre, ou seja, aqueles que apresentam bulbos firmes, bem encapados e cujos bulbilhos, regularmente inseridos, sejam grandes e em número de até 20, pois, caso contrário, os bulbilhos internos tornam-se pequenos e afilados (conhecidos por palitos) (SIQUEIRA et al., 1985; ILLG & SIQUEIRA, 1986). Nessas características enquadra-se a maioria das cultivares de ciclo médio (alhos seminobres) e as de ciclo longo, que necessitam de vernalização ou frigorificação dos bulbos ou bulbilhos antes do plantio (alhos nobres) (SIQUEIRA et al., 1996).

Os alhos mais exigentes em fotoperíodo (dias mais longos) e frio para bulbificarem são mais sensíveis ao defeito genético-fisiológico chamado de pseudoperfilhamento ou pseudobrotação, que deforma o bulbo (bulbo-aberto) tornando-o impróprio para o comércio. Esse fenômeno tem sido associado, dentre outros fatores, a níveis elevados de nitrogênio e de água no solo, especialmente no estágio final da cultura (VASCONCELLOS et al., 1971; SOUZA & CASALI, 1986; COSTA et al., 1993). Plantas que produzem pseudobulbos podem ser reconhecidas durante os estádios de crescimento, pela presença de brotações laterais que surgem entre a bainha das folhas normais (SOUZA & CASALI, 1986). Nas regiões de origem (Ásia Central), onde o frio é natural, esse problema é inexistente. Nas condições limítrofes de produção, em latitudes menores que as do Sul do hemisfério, como por exemplo, no Estado de São

Paulo, necessita-se de aplicar horas de frio artificial nos bulbilhos, em câmaras frigoríficas (de 4°C a 8°C), por um período médio de 35 dias, para que possa ocorrer a bulbificação. Esta condição de frio artificial provoca o pseudoperfilhamento em taxas variáveis de acordo com outros componentes também indutores: chuvas ou excesso de umidade no começo do ciclo, adubação nitrogenada em cobertura na quantidade usada para os seminobres, plantio precoce (março a abril) e cultivares nobres mais sensíveis (SIQUEIRA et al., 1985; LISBÃO et al., 1993).

Outro problema fisiológico que reduz a conservação do alho é o chochamento (perda de água). O aumento da ocorrência de bulbos chochos tem sido correlacionado, dentre outros fatores, com doses crescentes de N no final do ciclo - bulbificação (COSTA et al., 1993).

As principais pragas que atacam o alho são os tripses (*Thrips tabaci*), ácaros (*Aceria tulipae*), lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*), traças (*Ephestia elutella*; *Cadra cautella* e *Plodia interpunctella*), caruncho das tulhas (*Araecerus fasciculatus*) e nematóide (*Ditylenchus dipsaci*), e as principais doenças são a ferrugem (*Puccinia allii*), mancha-púrpura (*Alternaria porri*), podridão-branca (*Sclerotium cepivorum*), fusariose (*Fusarium sp*), podridões bacterianas por várias espécies e viroses, essas transmitidas por afídeos, principalmente pulgões (TRANI et al., 1997). Para controlar essas doenças e pragas, deve-se evitar as áreas infestadas, utilizar alho-semente de boa procedência e fazer rotação de cultura com feijão, vagem e outras hortaliças de verão (TAVARES et al., 1998).

O Brasil produz, atualmente, cerca de 60% do alho que consome e importa o restante da Argentina, Espanha, Chile e China. Segundo dados da FAO (2003), a produção mundial de alho fica em torno de oito milhões de toneladas. Estima-se o consumo anual de alho no Brasil em torno de 100.000 toneladas, para uma produção nacional anual de cerca de 120.000 toneladas (IBGE 2001). Embora a produção tenha aumentado na última década, os rendimentos médios das lavouras ainda são baixos, cerca de 7,0 t/ha (FAO 2001; IBGE 2001), mantendo-se nestes níveis até o presente. Tomada regionalmente, a variação de produtividade é muito grande, com alguns produtores chegando a produzir até mais de 13 t/ha, enquanto outros não colhem nem 1 t/ha (BUSO et al., 2004). No estado de São Paulo a produção em 2007 foi de 860 ton em uma área de 105,50 ha (IEA 2008). Fatores como clima, solo, suscetibilidade a

doenças e cultivares apropriados estão como as principais fontes desta variação de rendimento no país (MENEZES SOBRINHO, 1997; BUSO et al. 2004).

O Estado de São Paulo já conta com um bom número de cultivares de alho disponíveis aos produtores. As regiões Sul e Sudeste produzem 80% do alho nacional. Os estados que mais produzem são Santa Catarina, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, Espírito Santo e São Paulo (MENEZES SOBRINHO, 1997).

No estado de São Paulo, destacam-se como produtores, os municípios de Arealva, Vargem Grande do Sul, Piedade, Pilar do Sul, Ibiúna, Birigui, Divinolândia, Botucatu, Itatiba, Tietê, Tatuí, Araras, Três Fronteiras, Ribeirão Preto, Jundiaí, Ilha Solteira e Piracicaba (TRANI et al., 1997).

Mesmo com flutuação regional de rendimento, o alho é uma cultura muito apropriada para agricultura familiar por demandar mão de obra contínua numa área reduzida em função do adensamento de plantio, ao redor de 60 plantas por m<sup>2</sup> de canteiro, totalizando cerca de 450 mil plantas por ha. Os dentes ou bulbilhos são a estrutura de reserva do alho dentro dos bulbos e são as unidades de plantio, encarecendo muito a lavoura. A qualidade destes bulbilhos e a genética da cultivar são as variáveis mais importantes para o aumento de rendimento da cultura. Como o alho é uma espécie tipicamente de propagação vegetativa (KOUL & GOHIL, 1970; KOTLINSKA, et al. 1991), o uso da variabilidade genética no melhoramento fica condicionado às mutações naturais ou induzidas, bem como às coletas de germoplasma de várias origens com testes posteriores de avaliação. Processos biotecnológicos como a cultura de meristemas *in vitro*, variação somaclonal e mais recentemente de transgenia também podem contribuir para obtenção de uma nova cultivar. O desenvolvimento de protocolos de obtenção de plantas completas de alho via cultura de ápices meristemáticos caulinares é de fundamental importância, pois explantes podem ser utilizados para processos de transformação genética (biobalística e cocultivo com *Agrobacterium*), desinfecção de patógenos, principalmente viroses em cultivares comerciais e manutenção da fidelidade genética das plantas matrizes de alto valor comercial (KERBAUY, 1999).

## **2.2 Cultura de Tecidos em Alho**

A cultura de tecidos é uma terminologia genérica que serve para representar todo um conjunto de técnicas de manipulação *in vitro* de células, protoplastos, órgãos e tecidos somáticos vegetais. Consiste na criação de condições específicas quanto a meios

de cultura e controle de ambiente para o restabelecimento *in vitro* da divisão, crescimento e diferenciação celulares. Aos meios de cultura são fornecidas combinações e concentrações adequadas de compostos inorgânicos e orgânicos, além de reguladores de crescimento. O meio básico de cultura de tecidos vegetais mais conhecido e difundido entre os diversos laboratórios de biotecnologia é o idealizado por MURASHIGE & SKOOG (1962), denominado simplifadamente MS. Entretanto, muitos outros são conhecidos na literatura específica.

As vantagens de cultivar de alho livre de vírus quando comparado com plantas infectadas foram claramente demonstradas por MESSIAN et al. (1981) e depois por WALKEY & ANTILL (1989). Estes últimos autores compararam a produtividade média de plantas infectadas e livres de vírus, encontrando, em cinco das seis variedades testadas, um aumento substancial na produtividade das plantas fitossanitariamente “limpas”, de 33% a 88%, quando comparadas às plantas infectadas (ILLG et al., 1983).

ILLG et al. (1983), descreveram a técnica da cultura de tecidos, adaptada às variedades comerciais de alho por microbulbilhos, visando ao melhoramento fitossanitário *in vitro* e ao estudo do potencial da variação somaclonal para fins de seleção de novos clones.

Para se desenvolver uma metodologia de produção de híbridos somáticos de alho há necessidade, em primeiro lugar, de se identificar os genótipos que possuam capacidade para regenerar plantas a partir de células. Os primeiros protocolos de regeneração para *Allium sativum* com resultados positivos foram desenvolvidos a partir de folhas.

As regenerações via embriogênese somática ou organogênese, com a utilização de diferentes explantes de alho, sempre são relatadas na literatura com altas taxas de frequência de regeneração. Diferentes explantes do alho foram utilizados, tais como: bulbilhos, meristemas, raízes (HAVEL & NOVÁK, 1986), diferentes partes das folhas (distais e basais) (REICHART et al., 1988), caules (ILLG et al., 1983), discos basais (RAVNICAR et al., 1993), entre outros. No entanto, os explantes que deram melhores resultados foram os das pontas meristemáticas das raízes (HAQUE et al., 1997; MARTÍN-URDÍROZ et al., 2004) e de ápices meristemáticos caulinares (MOHAMED-YASSEEN et al., 1994).

Os estudos revelam que diferentes reguladores de crescimento foram adicionados aos meios, tais como: ácido jasmônico (RAVNICAR et al., 1993), auxina

NAA, citocinina BAP, auxina sintética 2,4-D (ILLG et al., 1983), citocinina TDZ (YASSEN et al., 1993), auxina IAA, citocinina artificial KIN (REICHART et al., 1988). Porém, o regulador que proporcionou melhor resultado na desdiferenciação celular foi o 2,4-D (ILLG et al., 1983).

As citocininas estimulam a divisão das células vegetais e a formação e atividade dos meristemas apicais. Apesar de regularem muitos processos celulares, o controle da divisão celular é o processo central no crescimento e no desenvolvimento vegetal, sendo considerado indicador para essa classe de reguladores de crescimento, principalmente na cultura de tecidos (TAIZ & ZEIGER, 2004).

As auxinas são uma classe de hormônio vegetal que estimula o alongamento celular de coleótilos e segmentos caulinares, divisão celular em culturas de calos na presença de citocininas e formação de raízes adventícias em folhas ou caules excisados (TAIZ & ZEIGER, 2004). Meios somente com auxina ou com alta relação auxina/citocinina mantêm a divisão celular, levando à formação de calos (CAPLIN & STEWARD, 1948).

Os protocolos de micropropagação de alho devem permitir o crescimento *in vitro* e subsequente bulbificação também *in vitro* por meio de formação de microbulbinhos ou simplesmente bulbinhos. Microbulbinhos são estruturas viáveis de reserva, induzidas *in vitro* sob estresse fisiológico ou mediante a combinação de reguladores de crescimento (RACCA et al., 1989).

O crescimento de ápices caulinares, seguido pela bulbificação *in vitro*, assegura a fixação de genótipos e a sua transferência para condições naturais de campo, sem a necessidade prévia de aclimação (MOHAMED-YASSEEN et al., 1994). Da mesma forma, a alta frequência de embriões e brotos formados por embriogênese somática ou organogênese respectivamente, seguida pela bulbificação *in vitro* das plantas obtidas, permite a redução de perdas por aclimação. Desta forma, a bulbificação *in vitro* pode ser útil (MOHAMED-YASSEEN et al., 1994).

A microbulbificação *in vitro* constitui um avanço tecnológico muito importante, pois permite a transferência para terra de plantas provenientes da cultura de ápices meristemáticos sem perdas pelo processo de aclimação, bastante drástico em outras espécies que não possuem estas estruturas. Além disso, é bastante útil em programas de intercâmbio de germoplasma (ILLG et al., 1983).

O nitrogênio influencia no crescimento e desenvolvimento de muitas plantas. Geralmente, o nitrato é a fonte principal, variando de acordo com a espécie e fatores

ambientais. Altas concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  podem ser tóxicas e prejudiciais ao desenvolvimento das plantas, mas em baixas concentrações têm aumentado o desenvolvimento destas (BARKER & MILLS, 1980). A presença de nitrogênio na forma amoniacal leva a uma diminuição da nitrificação, com redução de energia que ocorre na conversão enzimática de nitrato à amônia, com possível toxidez de  $\text{NH}_4^+$  no início do crescimento. A disponibilidade maior de  $\text{NO}_3^-$  na fase crítica (final do ciclo) tem prejudicado a bulbificação em alho, causando perfilhamento, segundo MAGALHÃES (1986).

### **2.3 Aspectos Gerais da Cultura da Cebola**

A cebola (*Allium cepa* L.), é uma espécie diplóide ( $2n=16$ ), herbácea, cuja parte comestível é o bulbo tunicado, que apresenta variações em formato, cor, pungência, tamanho e conservação pós-colheita (CASTELLANE et al., 1990). Pertence à família Alliaceae, com mais de 600 espécies, sendo alógama e predominantemente entomófila (MULLER & CASALI, 1982). No desenvolvimento da planta, as folhas, que podem ser cerosas ou não, apresentam disposição alternada, formando duas fileiras ao longo do caule. As bainhas foliares, nas quais as folhas se inserem, projetam-se acima da superfície do solo e formam uma estrutura firme, geralmente conhecida como pseudocaule. O caule verdadeiro localiza-se abaixo do solo, sendo um disco achatado, situado na extremidade inferior do bulbo, que emite raízes fasciculadas, pouco ramificadas, com maior concentração nos primeiros 30 centímetros do solo (JONES & MANN, 1963). É uma espécie de dias longos, ou seja, bulbifica somente com um fotoperíodo acima de um determinado valor crítico, que depende da cultivar (JONES & CLARK, 1943). Entretanto, a necessidade fotoperiódica mínima pode ser reduzida quanto menor a temperatura de cultivo. Quando as condições de temperatura e de fotoperíodo favorecem a bulbificação, inicia-se uma série de transformações, das quais as mais importantes são a dilatação das folhas basais a uma pequena distância acima do caule e o armazenamento de substâncias de reserva nessas folhas modificadas. Após a formação do bulbo, a planta toda entra em dormência, as lâminas foliares próximas ao centro do bulbo abortam e as bainhas destas sofrem um processo de engrossamento, convertendo-se em órgãos de reserva (JONES & MANN, 1963).

É uma planta de ciclo bienal, dividida em duas fases, sendo que a primeira compreende a fase vegetativa (1º ano) e a segunda, a fase reprodutiva (2º ano), que levará à produção de sementes.

A escolha de cultivares de cebola deve levar em conta as exigências de luz e as condições de temperatura e luminosidade das regiões. As variedades denominadas de dias curtos, que produzem com 10 a 12 horas de luz/dia, têm o ciclo precoce de 130 a 160 dias da sementeira à colheita; as de dias médios (11 a 13 horas diárias de luz) têm o ciclo de precocidade médio, de 161 a 200 dias; e as de dias longos (mais de 13 horas de luz/dia) têm ciclo tardio, superior a 200 dias. Quando as condições climáticas não satisfazem as exigências da cultivar, pode ocorrer a não formação de bulbos, a formação de charutos, a emissão precoce de pendão floral e a formação de bulbos pequenos (LISBÃO et al., 1993).

Nas cultivares de ciclo precoce, a maturação é evidenciada pela ocorrência do estalo (tombamento da parte aérea). As folhas mais velhas começam a secar e as túnicas externas dos bulbos adquirem a cor característica de sua variedade. Como nem todas as plantas amadurecem ao mesmo tempo, a melhor época de colher é determinada quando pouco mais da metade das plantas já se encontram estaladas. As cultivares tardias não apresentam o estalo e a maturação é constatada pelo secamento da parte aérea. A colheita deve ser feita quando a planta estiver ainda com 3 a 4 folhas verdes nas extremidades (LISBÃO et al., 1993).

A cebola possui grande importância social, pois a cebolicultura nacional é uma atividade praticada principalmente por pequenos produtores e sua importância socioeconômica fundamenta-se não apenas em demandar grande quantidade de mão de obra, contribuindo para a viabilização de pequenas propriedades, mas também em fixar os pequenos produtores na zona rural, reduzindo a migração para as grandes cidades.

Os maiores países produtores de cebola são a China, Índia, EUA, Turquia, Paquistão, Rússia, Irã e Japão. O Brasil produziu, em 2005, 1.098.790 toneladas, numa área plantada de 56.891 hectares, com produtividade média de 19,31 t/ha (AGRIANUAL, 2007). O estresse ambiental, a incidência de doenças e a utilização de cultivares não adaptadas aos sistemas de cultivo são as causas que mais contribuem para a baixa produtividade nacional. O consumo médio *per capita* anual de cebola no Brasil

é 6,5 kg, considerando-se consumo fresco e processado (CAMARGO FILHO & ALVES, 2005a).

No Brasil, a produção de cebola concentra-se em três áreas bem definidas: Sul (SC, RS e PR), com 53% da produção nacional, Sudeste (SP), com 24% da produção nacional, e Nordeste (PE, BA), com 23 % da produção nacional. Em 2005, os estados de Santa Catarina, São Paulo, Bahia e Rio Grande do Sul foram os maiores produtores (AGRIANUAL, 2007). Nos estados de Pernambuco e Bahia, a produção está principalmente localizada na região do submédio São Francisco, que atualmente é um dos mais importantes polos de produção de cebola do Brasil, sendo uma das vantagens desta região a possibilidade de ofertar o produto durante todos os meses do ano, devido às condições climáticas favoráveis. Minas Gerais destaca-se por apresentar a mais alta produtividade média observada no país, aproximadamente 41 t/ha, 54% superior à média nacional.

Em relação aos quatro países integrantes do Mercosul, o Brasil possui o maior mercado e também a maior produção de cebola. A Argentina e o Brasil são os principais países produtores de cebola do Mercosul (CAMARGO FILHO & ALVES, 2005b). Apesar da produtividade média da cebola brasileira ser mais baixa quando comparada à da Argentina e com os custos de produção mais elevados, novas fronteiras de produção estão surgindo em São Gotardo (MG), Cristalina (GO) e Chapada Diamantina (BA). Nesses novos polos predominam lavouras de grande extensão, mecanizadas, operando com elevado nível tecnológico. A produtividade média desses locais tem sido superior a 50 t/ha. Na região de Irecê (BA), a cultura da cebola vem evoluindo de forma considerável nos últimos anos. Os produtores de Irecê vêm adotando tecnologia de produção superior à da tradicional zona do submédio São Francisco (PE e BA).

#### **2.4 Bulbificação e Florescimento de Cebola**

Dentre as várias espécies cultivadas dentro do gênero *Allium*, da família Alliaceae, a cebola é a mais importante do ponto de vista econômico e de consumo. Apresenta como centro de origem primário a Ásia, incluindo o Paquistão e Afeganistão e como centro de origem secundário, o Oriente Médio e a região do Mediterrâneo (VAVILOV, 1963 e WENDELBO, 1971). Segundo ALAN et al. (2003), o processo reprodutivo completo da cebola (semente a semente) é demorado, levando cerca de dois anos e meio. Trata-se de uma espécie de dias longos com relação à formação dos bulbos

(JONES & MANN, 1963; BREWSTER, 1977), e as cultivares denominadas de dias curtos não são, particularmente, plantas de dias curtos, simplesmente exigem menos horas de luz (mínimo crítico) para bulbificação. Por outro lado, ainda que a duração do dia seja o principal fator no processo de bulbificação, os seus efeitos podem ser modificados pela temperatura (HOLDSWORTH & HEATH, 1950). A formação dos bulbos é acelerada em altas temperaturas, e, em condições de temperaturas baixas, é retardada. Temperaturas extremamente altas (acima de 32°C), na fase inicial de desenvolvimento das plantas, podem provocar a bulbificação prematura das plantas. Temperaturas inferiores a 10°C podem induzir o florescimento prematuro (JONES & MANN, 1963). Na passagem da fase vegetativa para a reprodutiva em *Allium cepa*, a temperatura é o fator de maior importância. No início do florescimento observa-se a emissão do escapo floral no centro da planta de onde se insere o pseudocaule e, durante esse processo, verifica-se uma acentuada produção de giberelinas antes da formação da inflorescência, sugerindo uma associação com o frio (vernalização) (JONES & MANN, 1963 & RIEKELS, 1972). Os efeitos da temperatura, em bulbos armazenados, sobre iniciação floral e subsequente emergência são complexos, pois a temperatura afeta mais de um processo (BREWSTER, 1977). A temperatura mínima para desenvolvimento do escapo floral dentro do bulbo é de 15°C e a iniciação floral é favorecida em temperaturas baixas, inferiores a 17°C, sendo mais favorável entre 9 - 13°C (BREWSTER, 1977).

Com relação ao comprimento do dia, HOLDSWORTH & HEATH (1950), concluíram que esse fator não afeta diretamente a iniciação floral, mas sob temperaturas baixas, dias longos favorecem a subsequente emergência das flores e alongamento dos escapos florais. Esta interação entre fotoperíodo e temperatura é tão importante que o comprimento do dia mínimo para uma cultivar não deveria ser especificado sem também se especificar a temperatura (JONES & MANN, 1963). Outro fator exógeno que pode afetar a formação do bulbo é o macroelemento nitrogênio, cuja deficiência pode apressar a formação do bulbo e reduzir o seu tamanho. Por outro lado, o excesso pode acarretar o retardamento da bulbificação e, conseqüentemente, a maturação. A necessidade de frio para induzir o florescimento é a principal dificuldade na produção de sementes de cebola em muitos países tropicais. Conseqüentemente, a vernalização artificial tem sido utilizada para induzir o florescimento em cebola. No Brasil, apenas os

estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul teriam condições de produção de sementes sem a vernalização artificial dos bulbos-mãe (MULLER & CASALI, 1982).

Na extremidade de cada escapo floral se forma uma inflorescência esférica simples tipo umbela, envolta por uma película que se rompe antes da abertura das flores. A flor é hermafrodita e compreende três carpelos fundidos em seu pistilo, seis estames (três internos e três externos), um estilete, três segmentos de periantos interiores e três exteriores. O ovário é súpero e contém três lóculos, com dois rudimentos seminiais em cada um. Os nectários se localizam na base dos estames e o néctar é acumulado entre os estames internos e externos. Quando a flor se abre, o pistilo tem um centímetro de comprimento, mas não está receptivo para o pólen que é liberado. Adquire tal condição quando atinge aproximadamente cinco centímetros de comprimento. As anteras emitem quase todo o pólen durante um período de 9-17 horas, 26 a 36 horas antes que o estigma esteja receptivo. Esta diferença entre a liberação do pólen maduro e a não receptividade do estigma explica porque a cebola é uma planta de polinização tipicamente cruzada (alógama). Tal fenômeno recebe o nome de protandria ou dicogamia protândrica. A autopolinização é possível entre flores de uma mesma umbela ou de diferentes umbelas de uma mesma planta, embora predomine a polinização cruzada. O pólen de planta estranha se desenvolve mais rapidamente que aquele da própria planta, reforçando a condição de alogamia. A polinização é realizada principalmente por abelhas, ainda que seja frequente também a intervenção de moscas e vespas (MALUF, 1999).

## **2.5 Produção de Cultivares Híbridos e de Polinização Aberta**

No segmento da produção, a preocupação com a competição externa colocou o atendimento às exigências do mercado como o principal centro de atenção do agronegócio da cebola. Neste aspecto, os produtores procuram por produto com maior competitividade em qualidade, custos e preços, optando por cultivares que garantam maior produtividade, apresentem maior grau de resistência às doenças e forneçam produtos comerciais com alto padrão de qualidade e maior produtividade. Estas preferências incluem cultivares de polinização aberta ou híbridos, que proporcionem uma colheita uniforme, exatamente dentro da época programada (VILELA et al., 2002). Adicionalmente, tais cultivares ou híbridos devem exibir padrão comercial similar ao do produto importado, especialmente quanto à uniformidade no tamanho do bulbo, cor, retenção de escamas e sabor. Ademais, percebe-se clara avidez por tecnologias para produção de cultivares de cebola menos pungentes (tipos doces ou suaves), mais

adequadas para consumo fresco em saladas e tipos mais apropriados à industrialização (flocos e pó) e, também, cultivares adequadas para cultivo em sistemas orgânicos, como forma de agregar maior valor ao produto nacional (VILELA et al., 2002).

Os maiores países produtores de cebola utilizam híbridos F<sub>1</sub> na quase totalidade de suas áreas de cultivo. No Brasil, mais de 70% das áreas ainda utilizam cultivares de polinização aberta. Os poucos híbridos plantados no Brasil são importados e se adaptam a uma área muito restrita do território. As cultivares importadas caracterizam-se pelos bulbos globulares achatados, película amarela clara e fina, escamas espessas, conteúdo baixo de matéria seca, sabor, odor e pungência mais suaves e pouca cerosidade na folha. Possuem adaptação ampla quanto ao comprimento de dia, são bastante produtivas e resistentes ao florescimento, mas muito suscetíveis a doenças foliares (MALUF, 1999).

O desenvolvimento de híbridos de cebola a partir de germoplasma nacional é uma necessidade urgente para contribuir para a elevação da produtividade. A grande limitação é que o germoplasma nacional é basicamente Baia Periforme e os híbridos são predominantemente Baia x Baia, não tendo apresentado grandes vantagens sobre material de polinização aberta.

O tempo para obtenção de híbridos de cebola é de 15 a 20 anos, devido a um ciclo semente-semente da cultura levar dois anos. A semente é plantada e os bulbos são selecionados, colhidos e armazenado no primeiro ano. No segundo ano, os bulbos são vernalizados artificialmente em câmaras frigoríficas para florescimento no campo e produção de sementes (JONES & MANN, 1963). Para reduzir os custos da semente híbrida de cebola, a utilização de macho-esterilidade, genético-citoplasmática, é a mais difundida entre as empresas produtoras de sementes, dentro e fora do país.

O longo ciclo, juntamente com a baixa variabilidade das linhas A (macho-estéril-MS) e B (linha mantenedora), tem limitado a obtenção de híbridos no Brasil. Utilizando-se a técnica da cultura de tecidos vegetais, especialmente a cultura *in vitro* de óvulos ou ovários de cebola, é possível reduzir o tempo de obtenção de linhas “C” homozigotas. O melhoramento de cebola resume-se muitas vezes na fixação de algumas linhas A/B e na obtenção do maior número possível de linhas C (linha polinizadora) para análise da capacidade específica de combinação.

## **2.6 Melhoramento Genético da Cebola e Macho-esterilidade Genético-Citoplasmática**

A cebola evoluiu a partir de genitores silvestres que ocorrem nas regiões montanhosas da Ásia Central (BREWSTER, 1994). Foi levada para o norte da África provavelmente logo após a domesticação, pois há evidências arqueológicas, relatos na literatura e ilustrações de cultivo no Egito antigo, há aproximadamente 5 mil anos. A partir dali, os romanos disseminaram a planta na Europa, onde se tornou muito popular na Idade Média (VAUGHAN & GEISSLER, 1997). Foi introduzida nas Américas por Cristóvão Colombo (SWAHN, 1997). O germoplasma de cebola difundido desta forma, através das viagens e do comércio internacional, lentamente se tornou adaptado a cada região para onde foi levado, originando variedades locais ou crioulas. Estas podem ser definidas como populações que apresentam alta capacidade de tolerar estresses bióticos e abióticos, resultando numa grande estabilidade de produção e num nível intermediário de produtividade sob condições de baixa tecnologia agrícola (ZEVEN, 1998).

No Brasil, o marco inicial do melhoramento genético de cebola é atribuído aos imigrantes açorianos que colonizaram as regiões de Rio Grande e Pelotas no século XVIII (FONTOURA, 1994). As variedades introduzidas por esses colonizadores estiveram expostas à ação da seleção natural e humana, constituindo populações distintas, adaptadas às condições locais do ambiente. Tais fatores garantiram a formação de um valioso banco de genes desta espécie no Sul do Brasil. Esse germoplasma vem sendo utilizado em quase todos os programas de melhoramento de cebola no Brasil, tanto de instituições públicas de pesquisa como da iniciativa privada (LISBÃO, 1993).

A cebola é diplóide ( $2n = 2x = 16$ ), com genoma nuclear de 16.415 Mbp/C, aproximadamente igual ao trigo hexaplóide (ARUMUGANATHAN & EARLE, 1991).

É uma espécie preferencialmente alógama, que apresenta protandria, em que as anteras das flores amadurecem antes que o estigma esteja receptivo, resultando em 75-95% de polinização cruzada. Devido a isso, a cebola apresenta alta depressão por endogamia. BREWSTER (1994) comparou linhas endogâmicas com autofecundação e populações sem autofecundação e constatou que as linhas endogâmicas apresentaram redução de 36% na produção, atraso em 12 dias na maturidade e aumento de 2 a 12% de bulbos perfilhados. Após três gerações de autofecundação, a sobrevivência das plantas caiu para 50%, e o baixo vigor resultou em queda de 30% na produção de sementes da plantas sobreviventes.

O cruzamento de linhas divergentes pode resultar em híbridos superiores a ambos os pais (heterose) (GARDNER & EBERHART, 1966). Em vários países, como Estados Unidos, Japão e Holanda, a heterose em cebola tem sido explorada para produção de híbridos, em detrimento de cultivares de polinização aberta (MELO et al., 1988). Nos EUA, já no início da década de 70, a área cultivada com sementes híbridas era de 50 a 70% (GABELMA, 1974). Para as empresas produtoras e comercializadoras de sementes, os híbridos têm a vantagem de proteção por direito de propriedade, chamada de biológica, pois as linhas parentais, praticamente homozigotas, são exclusivas e, portanto, naturalmente asseguradas (MELO et al., 1988). A produção de sementes híbridas é baseada na esterilidade genético-citoplasmática, reportada primeiramente por JONES & EMSWELLER (1936), que é condicionada por um par de genes recessivos nucleares (**ms/ms**) que interagem com um fator de esterilidade (**S**) encontrado no citoplasma (JONES & CLARKE, 1942).

Uma sequência de etapas sobre a utilização de macho-esterilidade (ME) no processo de obtenção de híbridos, segundo MELO et al. (1988), é transcrita a seguir e ligeiramente modificada nesta dissertação:

Devem ser desenvolvidas duas linhas isogênicas, inclusive para o gene nuclear recessivo (**ms**) expressando a macho-esterilidade, portanto **msms**. Elas devem diferir apenas quanto ao fator citoplasmático **S** que condiciona ME. A primeira é designada como linha A ou macho-estéril (**Smsms**) e a outra linhagem deve conter o gene **N** citoplasmático, que restaura a fertilidade masculina como se fosse epistático ao alelo nuclear **ms** e é designada de linha B, ou mantenedora (**Nmsms**) (Cícero Beserra de Menezes/SAKATA, comunicação pessoal).

A produção em escala comercial de híbridos de cebola envolve ainda uma terceira linha denominada de linha C, ou parental polinizador. A linha C deve apresentar uma alta capacidade específica de combinação com a linha A (ME), para resultar em híbrido F<sub>1</sub> com características superiores. Salienta-se que a linha mantenedora de genótipo **Nmsms** é a única capaz de produzir 100% de descendência macho-estéril ao polinizar as plantas macho-estéreis. O reconhecimento da planta macho-estéril se dá por alterações da coloração de anteras (amarelo-pálida) com filetes menores do que os normais e ausência ou reduzida quantidade de pólen (JONES & CLARK, 1943).

Segundo PIKE (1986) e MELO et al. (1988), a obtenção de híbridos F<sub>1</sub> de cebola, competitivos no mercado, pelo método convencional, é um trabalho de melhoramento a longo prazo e oneroso, principalmente no início do programa, quando

da identificação das plantas ME (linha A) nas populações de polinização aberta (PA) de cebola e das linhas mantenedoras (B). Além disso, há necessidade de obtenção de híbridos e avaliação em “test-crosses” ou em dialelos parciais. Por isso, o desenvolvimento de protocolo eficiente de micropropagação *in vitro* de plantas de cebola macho-estéreis por meio da inoculação de gemas fasciadas de disco de caule na base dos bulbos é interessante, pois dispensaria o uso de linhas mantenedoras (RODRIGUES, 1994).

## **2.7 Obtenção de Linhas Duplo-Haplóides**

A cultura *in vitro* de ovários ou óvulos não-polinizados tem sido utilizada com o objetivo de encurtar os ciclos de melhoramento, criar variabilidade e desenvolver novas variedades. A indução de plantas haplóides ou duplo-haplóides a partir da cultura de anteras (androgênese) ou óvulos (ginogênese) oferece ao melhoramento convencional a possibilidade de obter linhas puras, derivadas de grãos de pólen ou óvulos oriundos de plantas da geração F<sub>1</sub> ou F<sub>2</sub>.

Em síntese, a obtenção de plantas duplo-haplóides pelo processo de ginogênese *in vitro* consiste na regeneração de plantas a partir de óvulos imaturos, direta ou indiretamente (via calos), e posterior duplicação cromossômica, gerando linhas homozigotas.

A obtenção de haplóides pelo processo *in vitro* é fortemente influenciada pelo *background* do material genético utilizado. A Universidade de CORNELL iniciou um projeto de obtenção de linhas duplo-haplóides em cebola no ano de 1999. Os pesquisadores desenvolveram um protocolo efetivo de produção e duplicação de plantas haplóides. A avaliação de plantas duplo-haplóides obtidas mostrou grande diferença em vigor de planta, viabilidade de pólen e produção de sementes (Cícero Beserra de Menezes/SAKATA, comunicação pessoal).

O Brasil é, atualmente, muito carente em novas cultivares de cebola disponíveis aos produtores. Em Santa Catarina são cultivadas as variedades Bola Precoce e Crioula. No Rio Grande do Sul são cultivadas as variedades tardias (Pera Norte) e Baias Precoces. A região Nordeste cultiva cebolas precoces IPA 10, IPA 11, Texas Grano 502, Alfa Tropical e Alfa São Francisco. Híbridos têm sido testados na região de Irecê, onde existem alguns produtores mais tecnificados. Nos estados de São Paulo e Minas Gerais são plantados os híbridos Superex, Optima, Perfecta, Mercedes e Gobi. Novos

híbridos têm sido testados periodicamente nesta última região, mas a suscetibilidade a doenças tem limitado a adaptação de muitos dos materiais testados.

No Brasil são poucos os programas de melhoramento de cebola. Programas públicos podem ser encontrados na ESALQ/USP, EPAGRI, EMBRAPA e IPA. Esses programas visam à obtenção de variedades PA (polinização aberta), através de melhoramento populacional ou seleção recorrente. A empresa privada SAKATA Seed Sudamerica Ltda vem realizando melhoramento genético no Brasil. O seu programa de melhoramento de cebola utiliza em grande parte germoplasma nacional, já amplamente adaptado. Em 2006 foram lançados dois híbridos (Bella Dura e Bella Vista), os quais podem ser considerados os primeiros híbridos criados e desenvolvidos no Brasil.

## **2.8 Cultura *in vitro* de Gametófitos Femininos e/ou Masculinos Para a Produção de Haplóides**

GUHA & MAHESHWARI (1964, 1966) realizaram os primeiros estudos para produção de plantas haplóides a partir de anteras, utilizando a planta *Datura*. Segundo MUKHAMBETZHANOV (1997), a cultura de anteras já foi empregada para a obtenção de calos, embrióides e plantas em mais de 247 espécies, 88 gêneros e 34 famílias. Entretanto, pesquisa no desenvolvimento das técnicas *in vitro* de cultivo de anteras tem sido confinada a algumas espécies, que incluem fumo, cevada, trigo, triticale, arroz, milho, colza e couve (PETERS et al., 1999).

No caso da cultura de anteras, o estágio dos micrósporos na formação de plantas haplóides, a composição do meio de cultura e as condições de cultivo são os fatores que mais influenciam o processo.

Os gametófitos femininos podem ser uma fonte alternativa para obtenção de plantas haplóides em espécies não responsivas à cultura de anteras (PAVLOVA, 1987; CAMPION & ALLONI, 1990; CHOUB et al., 1994). No entanto, a ginogênese *in vitro* tem sido menos estudada que a androgênese. Adicionalmente, a cultura de óvulos não fertilizados é uma técnica interessante, pois se constitui na única possibilidade de obtenção de haplóides em plantas macho-estéreis (MUKHAMBETZHANOV, 1997).

Uma das desvantagens da cultura de óvulos é a limitação de sacos embrionários, que é de apenas um por óvulo, enquanto nas anteras podem ocorrer ao redor de mil a dois mil grãos de pólen. A resposta *in vitro* da cultura de óvulos ou ovário é,

usualmente, menor que 15% e, normalmente, menos eficiente que a cultura de anteras quando essa tecnologia encontra-se desenvolvida (PETERS et al., 1999).

Além disso, como o saco embrionário é cercado por tecido somático (nucelo e integumentos), sempre há a possibilidade de indução morfogênica não apenas do gametófito feminino (MUKHAMBETZHANOV, 1997).

A recuperação de plantas haplóides, a partir de cultura de ovários, é difícil e existem muitos transtornos e tentativas fracassadas. Durante o cultivo, os ovários e óvulos, na maioria das vezes, apenas aumentam seu tamanho pela proliferação celular do tecido somático em volta do gametófito feminino, mas o saco embrionário não mostra atividade morfogênica. A produção de haplóides a partir de ovários e óvulos não fertilizados é praticada desde a década de 50 (MUKHAMBETZHANOV, 1997).

SAN NOEUM (1976) obteve a primeira planta haplóide a partir de óvulos não fertilizados da cultura de *Hordeum vulgare*.

Demonstrou-se que a produção de haplóides é o resultado do desenvolvimento anormal do gametófito feminino e subsequente embriogênese direta ou formação de calos (embriogênese indireta). A planta haplóide tem somente metade de seu patrimônio genético, sendo, portanto, estéril. A duplicação de seu número cromossômico de maneira espontânea, ou induzida pela aplicação de colchicina ou outras drogas, recupera a condição diplóide e restaura a fertilidade. Esta planta, chamada duplo-haplóide, será totalmente homozigota, uma vez que cada cromossomo terá a sua cópia exata (MORAES-FERNANDES, 1990).

Há muito se sabe que vários fatores são limitantes no desenvolvimento de plantas haplóides na cultura de óvulos: genótipo, estágio de desenvolvimento do gametófito feminino, composição do meio de cultura e condições de cultura (FERRIE et al. 1995). Para obtenção de plantas haplóides, a partir de cultura de óvulos não fertilizados, é necessária atenção ao genótipo. Este problema de resposta a um genótipo específico restringe o campo do uso da produção de haplóides. (MUKHAMBETZHANOV, 1997).

O grau de desenvolvimento do saco embrionário é indiretamente definido pelo estágio de desenvolvimento do grão de pólen, ou com a ajuda de preparação histológica do óvulo. Na cultura de *Zea mays*, induziram-se calos a partir de ovários isolados 5 dias antes da antese até o desenvolvimento do estágio penicilar. Isso demonstra que, ao contrário da cultura com gametófitos masculinos, em que o estágio unicelular é o ótimo, os gametófitos femininos podem se desenvolver a partir de um estágio de

desenvolvimento variado. Mas, em geral, o último estágio de desenvolvimento do saco embrionário é o tempo ótimo para a maioria das espécies. (MUKHAMBETZHANOV, 1997).

Em relação aos meios de cultivo, o açúcar está incluído em todos os meios de cultura de óvulos não fertilizados. E a adição de reguladores de crescimento ao meio basal também é necessária (MUKHAMBETZHANOV, 1997).

Outro fator que influencia a indução de haplóides por ginogênese *in vitro* é a idade das plantas doadoras, e as condições ambientais em que elas cresceram (GIBSON, 1988; HONKANEN et al., 1992).

Segundo SEIGNER (1992), dois padrões de ginogênese foram observados na cultura de óvulos a partir de sacos embrionários: a) embriogênese seguida da formação da planta (embriogênese direta) e b) embriogênese seguida da formação de calo e posteriormente formação de planta (embriogênese indireta).

Embriogênese direta a partir do saco embrionário é o processo mais desejável, porque as plantas provindas de calos podem ser albinas ou demonstrar diferentes níveis de ploidia.

MARTINEZ et al. (2000) e JAKŠE et al. (1996) afirmam que diferentes técnicas de obtenção de plantas haplóides têm sido utilizadas, sendo a ginogênese por meio da inoculação em meio nutritivo de ovários ou óvulos – ao invés de anteras na androgênese – a mais indicada para cebola, embora a taxa de obtenção de plantas haplóides possa ser considerada baixa (em média 20%).

## **2.9 Ginogênese *In Vitro* em Cebola**

Segundo KAHANE et al. (1992), a planta de cebola tem reduzida capacidade natural de multiplicação vegetativa, mas pertence a uma família em que vários tecidos podem ser utilizados *in vitro* para expressar alto potencial de regeneração somática. Segundo GEOFFRIAU, et al. (1997b), a técnica de obtenção de plantas haplóides e duplo-haplóides é de grande importância no melhoramento genético da cebola, tornando-se uma poderosa ferramenta para estabelecimento mais rápido de plantas homozigotas como parentais na obtenção de híbridos. O primeiro estudo a tentar cultivar óvulos não fertilizados de cebola foi o de GUHA & JOHRI (1966), mas falhou em produzir plantas. Em cebola, estudos mostraram que a cultura de óvulos (ginogênese) é mais efetiva quando comparada à androgênese (BRANTS, et al. 2001; MICHALIK, et al., 2000).

CAMPION et al. (1984) falharam na tentativa de induzir androgênese, porque em seu estudo, as anteras degeneraram depois de 8 a 10 dias, e ao contrário, os ovários e óvulos aumentaram quando cultivados no mesmo meio de androgênese. A partir daí, novos experimentos de ginogênese *in vitro* se iniciaram em cebola. O primeiro protocolo descrito para produção de cebolas haplóides através de cultura de botões florais via ginogênese que obteve sucesso foi o de MUREN (1989) com 70% de plantas haplóides.

Depois disso, várias adaptações deste protocolo foram feitas utilizando-se botões florais (SMITH et al., 1991; BOHANEK, 1999; GEOFFRIAU et al., 2006), ovários (KELLER, 1990; JAKŠE et al., 1996) e óvulos (CAMPION et al., 1992). Devido ao fato dos autores considerarem a cultura de óvulos muito trabalhosa e com pouca resposta ginogênica, a cultura de botões florais foi considerada como a mais prática, principalmente quando se trabalha com um grande número de acessos (CAMPION et al., 1992; BOHANEK et al., 1995; GEOFFRIAU et al., 1997b).

BOHANEK & JAKŠE (1999) observaram calos basais nos botões cultivados em meio de ginogênese B-5 suplementado com 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA após um mês de cultura, o que nunca havia sido notado até então em cultura de botões florais de cebola, e sugeriram que neste caso, possivelmente o órgão que estimulou esta formação foi o nectário, que normalmente é removido nas culturas de ovários. Depois disso, ALAN et al. (2003) também observaram calos basais em cultura de botões florais de cebola.

O ideal seria o desenvolvimento de um protocolo de cultura de ovários no qual a frequência de indução de haplóides fosse elevada e independente do genótipo (BOHANEK et al., 1995). Como a taxa de regeneração é baixa, os experimentos devem ser grandes (JAKŠE et al., 1996).

BOHANEK et al. (1995) também observaram que o método de marcadores isoenzimáticos permite usar alelos fáceis de distinguir e que as bandas não sobrepõem com aquelas de outros *loci*. Recomendam o uso de isoenzimas para determinação de plantas de cebola homozigotas e heterozigotas regeneradas *in vitro* via ginogênese, pois utilizando este método observaram que 59% das plantas regeneradas eram homozigotas. Afirmam ainda que alto grau de homogenidade e estabilidade genética são supostamente os maiores atributos das linhas duplo-haplóides. CAMPION et al. (1995)

também afirmam que alta estabilidade genética é característica na maioria das linhas duplo-haplóides produzidas.

Nos estudos de GEOFFRIAU et al. (1997b) observou-se maior taxa de regeneração via ginogênese de botões florais de cebola provenientes de linhas autofecundadas, o que pode estar relacionado à eliminação de genes deletérios durante a autofecundação. Segundo esses autores, populações de polinização aberta podem ainda possuir tais genes em diferentes frequências, o que pode dificultar a produção de embriões ginogênicos em cebola nessas populações. Ao contrário JAKŠE et al. (2003), sugerem que o fato de muitos embriões não conseguirem desenvolver plantas pode ser devido à alta depressão por endogamia presente em cebola.

Na tabela 1 pode-se ver um resumo da evolução dos estudos com ginogênese *in vitro* de cebola.

**Tabela 1** – Evolução dos estudos no processo de ginogênese *in vitro* de cebola ao longo dos anos.

Referência	Cultivares	Órgão	% de plantas regeneradas	% de haplóides	% de diplóides	% de duplo-haplóides homocigotos
KELLER (1990)	9 variedades	Óvulos	0,11			
		Ovários	0,08	-	-	-
		Bs. florais	0,04			
CAMPION & ALLONI (1990)	43 genótipos	Óvulos	0,05	43	-	-
CAMPION et al. (1992)	4 cultivares	Óvulos	1,35	88	-	-
BOHANEK et al. (1995)	4 cultivares	Óvulos	0,81	61	39	59
		Ovários	0,02			
JAKŠE et al. (1996)	4 cultivares	Ovários	1,37	64	20	91
GEOFFRIAU et al. (1997b)	22 genótipos	Bs. florais	1,3	80	13	-
BOHANEK & JAKŠE (1999)	39 acessos	Bs. florais	5	90	10	88
MICHALIK et al. (2000)	30 genótipos	Bs. florais	0,98	-	-	-
MARTINEZ et al. (2000)	2 cultivares	Bs. florais	1,6	52	-	-
ALAN et al. (2003)	9 cultivares	Bs. florais	0,86	71	23	-
ALAN et al. (2004)	14 cultivares	Bs. florais	4,6	82	15	-
GEOFFRIAU et al. (2006)	5 cultivares	Bs. florais	12,4	-	-	-

Bs. = Botões.

## 2.10 Fatores que Influenciam a Ginogênese *In Vitro* em Cebola

Um dos fatores que influenciam a ginogênese é o meio básico e o efeito de combinações de fitorreguladores utilizados. Várias destas combinações já foram testadas: GA<sub>3</sub> (KELLER, 1990; CAMPION & ALLONI, 1990); NAA, IAA, TIBA, 2,4-

D, 2ip, 6-BA (CAMPION & ALLONI, 1990; CAMPION et al., 1992; BOHANEK et al., 1995); Thidiazuron (BOHANEK et al., 1995) PAA (JAKŠE et al., 1996). Porém, o meio inicial B-5 (GAMBORG, 1985), com algumas modificações (2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 6-BA e 100 g.L<sup>-1</sup> sacarose), é o mais utilizado.

Apesar de todos estes estudos, a taxa de regeneração via ginogênese em cebola continuava baixa e muito dependente do genótipo. BOHANEK et al. (1995) testaram ovários e óvulos dentre quatro cultivares, obtendo 1,1 a 7,6% de plantas regeneradas para ovários e 0,1 a 0,6% para óvulos; GEOFFRIAU et al. (1997b) estudaram 22 genótipos e obtiveram de zero a 11,1% de plantas regeneradas e MICHALIK et al. (2000), estudaram 30 genótipos; destes, 21 regeneraram de 0,2 a 10%.

MARTINEZ et al. (2000) começaram a testar o uso das poliaminas (PA) Putrescina e Espermidina na indução de ginogênese e demonstraram um efeito positivo no aumento do número de embriões ginogênicos em cultura de botões florais de cebola. Poliaminas são, segundo esses autores, reguladores de crescimento naturais, envolvidos em todos os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas. Um aumento na biossíntese endógena de PA demonstrou preceder ou acompanhar a calogênese (PONCHET et al., 1982), organogênese (ARIBAUD et al., 1994) e embriogênese somática (LIU et al., 1997) em várias plantas. GEOFFRIAU et al. (2006), com base nos bons resultados de MARTINEZ et al. (2000), testaram os efeitos das PAs Tyramina, Espermidina e Espermina e observaram que todas as PAs testadas tiveram efeito positivo na taxa de indução de embriogênese, sendo a espermidina e espermina, as que tiveram melhores resultados. Além disso, a espermina, em todas as concentrações testadas, aumentou a taxa de regeneração.

Outro fator que influencia a taxa de ginogênese *in vitro* é o tempo de germinação *in vitro* dos embriões, que varia de 46 dias (JAKŠE et al., 1996) até 174 dias (BOHANEK & JAKŠE, 1999) com máximo de germinação variando de 60-90 dias (JAKŠE et al., 1996; MARTINEZ et al., 2000); 100 dias (GEOFFRIAU et al., 1997b; MICHALIK et al., 2000) e 90-120 (ALAN et al., 2004). GEOFFRIAU et al. (1997b) afirmam que o tempo de germinação, em seu estudo, variou apenas de acordo com o ano. Mas nenhum outro autor cita a provável causa desta variação, que parece estar ligada principalmente ao genótipo.

Um fator não muito discutido e há pouco tempo estudado que também tem demonstrado influência na indução de ginogênese *in vitro* é a temperatura de estocagem

das umbelas antes da cultura *in vitro*. Em beterraba o pré-tratamento de frio em plantas estocadas promoveu a frequência de regeneração na cultura de óvulos (SVIRSHCHEVSKAYA & BROMOTOV, 1994). Com base nisto, PUDDEPHAT et al. (1999) pré-trataram umbelas de cebola estocadas com diferentes temperaturas e demonstraram que houve influência na ginogênese, com um aumento de 10 vezes na embriogênese de botões florais de plantas estocadas mantidas a 15°C, comparadas com 10°C ou 25°C. Outro estudo que demonstrou a influência da estocagem na ginogênese de cebola foi o de ALAN et al. (2004), que estocaram botões florais por três semanas a 10°C e afirmaram que ainda assim estes botões retiveram sua capacidade de ginogênese. Segundo os autores, a possibilidade de estocar botões florais em ambiente de temperatura controlada e de eles manterem sua capacidade ginogênica são importantes vantagens em casos de dificuldade em acessar a planta doadora e de trabalho limitado.

O fator mais discutido e que parece mais afetar a taxa de ginogênese é o genótipo da planta doadora e sua condição de crescimento. CAMPION et al. (1992) já haviam observado este fator, citado por quase todos os autores, que afirmam que o efeito de variedades e genótipos das plantas doadoras é considerado predominante na resposta ginogênica. (BOHANEK et al., 1995; GEOFFRIAU et al., 1997b; BOHANEK & JAKŠE, 1999; MICHALIK et al., 2000). Segundo JAKŠE et al. (1996), a influência do genótipo é maior que a composição do meio de cultura na taxa de indução de embriões. Segundo os mesmos autores, a cultivar com maior capacidade embriogênica também deve possuir maior número de regenerantes homozigotos.

GUHA & JOHRI (1966) estabeleceram que as flores deveriam ser coletadas quando a maioria dos micrósporos estivesse prestes a dividir (1ª mitose) ou no primeiro estágio binuclear. Este estágio corresponderia ao máximo de alongamento e aumento da flor antes da antese, e é neste estágio, segundo os mesmos autores, que os óvulos contêm o saco embrionário maduro. MUREN (1989) demonstrou que ovários 3 a 5 dias antes da antese eram os mais responsivos.

Inicialmente foram testados tamanhos de botões considerando botões pequenos (2,8-3,0 mm), médios (3,5-3,8 mm) e grandes (4,3-4,5 mm), se observou que os botões médios e grandes responderam com melhor taxa embriogênica. Estudos citológicos da microsporogênese do grão de pólen mostraram que as anteras dos botões pequenos encontravam-se em tétrades de micrósporos; nos médios, os micrósporos eram os mais abundantes; e nos grandes, foram encontrados micrósporo e grão de pólen binucleados.

O estágio de desenvolvimento do saco embrionário é o segundo fator mais importante no sucesso da cultura de gametófitos femininos. Quanto mais desenvolvidos, maior a probabilidade da indução de ginogênese. Em cebola, o saco embrionário está completamente maduro quando a maioria dos micrósporos está no estágio uni ou binucleado, correspondendo a flores num estágio um pouco anterior à antese (MICHALIK et al., 2000). Para KLUIN & KORZONEK (1999), isto corresponde ao comprimento do botão floral entre 3,4 a 4,5 mm. No estudo de MICHALIK et al. (2000), a maior taxa embriogênica também foi observada com os botões de tamanho entre 3,5 a 4,5 mm, provavelmente quando o saco embrionário estava maduro.

Estudos utilizando tamanho de botões pequenos (2-2 mm), médios (3-4,5 mm) e grandes (5-6 mm) mostraram que 30% dos pequenos e 20% dos médios e grandes vitrificaram ao acaso; que houve maior frequência de formação de calos basais em botões pequenos do que em médios e grandes (25% versus 10%) e que os botões pequenos foram menos ginogênicos que os médios (ALAN et al., 2003).

Avaliando-se novamente tamanhos de botões pequenos (2-2,5 mm), médios (3-4,5 mm) e grandes ( $\geq 4,5$  mm), observou-se que os botões florais pequenos tiveram pouca resposta ginogênica, os botões grandes tiveram resposta melhor que os pequenos, mas pior que os médios, e os médios tiveram a melhor resposta ginogênica (ALAN et al., 2004).

O desenvolvimento ginogênico começa apenas depois que o saco embrionário está maduro e organizado. Dividindo os botões em pequenos (2,3-3 mm), médios (3,1-3,7 mm) e grandes (3,8-4,4 mm), observaram que os botões pequenos se desenvolvem melhor *in vitro* que os médios e grandes. Através de cortes histológicos, observaram que aos 12 dias apenas sacos embrionários maduros estavam presentes em todos os óvulos examinados. O primeiro embrião ginogênico foi observado depois de 14 dias de cultura, isto é, quando somente sacos embrionários maduros estavam presentes nos óvulos. O período crucial para indução de ginogênese em cebola está entre a segunda e a terceira semana de cultura *in vitro*. Os autores não chegaram a uma conclusão sobre qual estágio foi o melhor para ginogênese. No caso da permanência *in vitro* dos óvulos, a oosfera dentro de alguns desses sacos embrionários pode desenvolver-se em embriões ginogênicos, aumentando a porcentagem de haplóides, pois plantas ginogênicas são geralmente derivadas de oosferas, porém isso não descarta a possibilidade da formação de embriões somáticos. O desenvolvimento do endosperma não parece ser essencial

para o crescimento dos embriões ginogênicos e embrião e endosperma foram observados juntos no mesmo óvulo (MUSIAL et al., 2005).

Por sua vez, GEOFFRIAU et al. (2006), analisando PAs endócrinas na ginogênese *in vitro* de cebola, mostraram um possível estágio crítico 8-12 dias após a inoculação, quando foram identificados os picos de Putrescina, Espermidina e total de PAs, indicando que a embriogênese já estava induzida e sugerindo que a embriogênese já ocorre oito dias após a inoculação, num processo que normalmente necessita de 70-80 dias para se observar a planta desenvolvida do embrião sair do ovário.

### 2.11 Ploidia de Plantas Ginogênicas de Cebola

A ploidia no processo *in vitro* de ginogênese em cebola pode variar de haplóide (n) para poliplóide (2n, 3n, 4n e 2n+n). Além disso, a ocorrência de duplicação espontânea (2n) acaba por ajudar ou facilitar esta técnica, já que este processo é mais vantajoso do que a duplicação utilizando drogas, por não comprometer a taxa de regeneração e por serem as plantas resultantes mais estáveis.

CAMPION & ALLONI (1990) foram os primeiros a observar duplicação espontânea (53%), que foi atribuída na época à baixa estabilidade das plantas haplóides.

Foi observada ocorrência de células haplóides e diplóides na mesma raiz (mixoplóides), sugerindo novamente a instabilidade dos haplóides (CAMPION et al., 1992).

As duplicações espontâneas têm a vantagem de não usar drogas – que podem ser tóxicas e nem tão eficientes – para a duplicação cromossômica (BOHANCE et al., 1995).

Não está claro quando (ou se) os mixoplóides (2n + n) irão tornar-se completamente 2n, o que é da maior importância para a fertilidade das plantas duplo-haplóides. A presença de triplóides homozigotos é evidência de que fusão nuclear pode ocorrer no processo ginogênico *in vitro* (JAKŠE et al., 1996).

Nunca foi encontrada relação entre qualquer variável testada e a ploidia nas plantas ginogênicas. E as plantas regeneradas duplo-haplóides espontâneas são mais estáveis que haplóides duplicados (GEOFFRIAU et al., 1997b).

GEOFFRIAU et al. (1997a) trataram plantas haplóides de cebola com Colchicina e Orizalin para obtenção de linhas superiores de duplo-haplóides. Tanto plantas tratadas com Colchicina quanto com Orizalin produziram mixoplóides e

afetaram o processo de regeneração, mas os autores consideraram as duas substâncias como eficientes, sendo que utilizando orizalin consideraram a qualidade das plantas melhor, isto é, sem alterações genéticas, redução de mixoplóides e mutações. Observaram ainda que plantas mixoplóides se tornam haplóides após uma multiplicação e que não parecem evoluir para  $2n$ .

O fato de em algumas plantas haplóides parte da inflorescência produzir sementes pode ser atribuído a estruturas genéticas mixoplóides, nas quais as células  $2n$  prevaleciam (BOHANEK & JAKŠE, 1999).

JAKŠE et al. (2003) testaram Orizalin e Amiprofos-Methyl (APM) em diferentes concentrações para duplicação cromossômica, já que, segundo os autores, o tratamento antimitótico de embriões ginogênicos isolados pode ser um método eficiente para obtenção de duplicação cromossômica em cebola. Estes autores consideraram o APM como mais eficiente para duplicação cromossômica devido à baixa toxicidade e alta capacidade de duplicação, com base na taxa de sobrevivência e eficiência de duplicação cromossômica. Aconselham, também, medir a ploidia em casa de vegetação, pois é mais provável que a ploidia já esteja estabelecida.

Plantas de cebola com níveis de ploidia diferentes de haplóides devem resultar de duplicação espontânea em um estágio inicial da primeira divisão celular do óvulo e/ou desenvolvimento embriogênico, mas a possibilidade do desenvolvimento ser de um óvulo não reduzido ou do tecido somático ( $2n$ ) não pode ser descartada. Não foi possível distinguir plantas ginogênicas com diferentes níveis de ploidia pelo seu vigor e característica bulbar, pois todas as plantas apresentavam grande tamanho e vigor de bulbo (ALAN et al., 2003).

ALAN et al. (2004) conseguiram 15% de plantas ginogênicas duplo-haplóides espontâneas e 82% de haplóides, que foram utilizadas para duplicação cromossômica testando APM e colchicina. Consideraram que o melhor tratamento foi com colchicina, que obteve maior taxa de sobrevivência e maior taxa de frequência de duplicação. Observaram ainda que o nível de ploidia pode afetar a fecundidade das plantas adultas, e que sementes deste estudo foram viáveis e puderam ser usadas para estabelecer linhas duplo-haplóides. Também não foi observada redução de vigor nestas linhas.

Em vários casos, o sucesso da indução de haplóides depende principalmente do genótipo e composição do meio, podendo alterar a taxa de regeneração. Na técnica de cultura de tecidos, um valor baixo de regeneração pode comprometer o sucesso da experimentação.

## 2.12 Micropropagação e Bulbificação em Cebola

Segundo os resultados obtidos por RODRIGUES (1994), uma das aplicações mais concretas da técnica de cultura de tecidos é a propagação vegetativa (micropropagação). Sua primeira aplicação foi através da cultura de ápices caulinares em orquídeas.

Em 1970, SMITH & MURASHIGE desenvolveram plantas de cebola a partir de meristemas apicais inoculados em meio contendo sais minerais, vitaminas e fitorreguladores. A atividade comercial da micropropagação concentra-se, principalmente, na limpeza clonal e multiplicação de espécies ornamentais.

Em cebola, estudos com micropropagação, principalmente proliferação de brotos, tiveram início em 1970. Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se como explante o tecido basal, sem formação de calos. Obteve-se alta estabilidade genética e desenvolvimento normal do sistema radicular, o que possibilitou o transplante desses materiais com sucesso.

Os principais componentes dos meios de cultura são os fitorreguladores, importantes para o crescimento, alongamento ou multiplicação da parte aérea, porém em elevadas concentrações podem ser fitotóxicos. Normalmente são usados em concentrações entre 1,0 a 5,0 mg.L<sup>-1</sup>. Dentre os fitorreguladores, as citocininas são fundamentais, pois induzem brotações *in vitro*. Vários trabalhos em cebola citam o 6-BA (6-benzylaminopurina) como mais eficiente para proliferação de parte aérea. As auxinas são usadas em concentrações mais baixas e normalmente anulam o efeito que as citocininas têm sobre o alongamento dos caules, sendo a mais comum em cebola o NAA (Ácido Naftaleno-acético).

Estudos de KAHANE et al. (1992) mostraram que na falta de citocininas não ocorreu regeneração a partir de parte basal de cebola e a presença de auxina pode não ser essencial para a regeneração. Tanto 6-BA quanto Kinetina induziram regeneração de brotos. De acordo com os mesmos autores, a partir da parte basal de um bulbo cultivado *in vitro* em MS suplementado com NAA e 6-BA ou KINETINA é possível obter mais de 250 plantas, porém quanto mais brotos houver por explante, menores eles serão. Os autores observaram também que não foram produzidos brotos de explantes que não continham uma parte do domo apical (células meristemáticas indiferenciadas), relacionado com a diferenciação celular no tecido.

HUSSEY (1976) sugeriu que a estimulação da produção de gemas axilares ocorre com a ruptura da dominância apical pela adição de fitorreguladores como as

citocininas. KAHANE et al. (1992) dizem confirmar que a citocinina é a mais determinante na regeneração de brotos axilares em cebola.

O desenvolvimento de um protocolo eficiente de micropropagação de cebola é interessante como técnica complementar à indução de duplo-haplóides *in vitro*, pois permitirá a multiplicação em escala destas plantas obtidas (CAMPION et al., 1995; GEOFFIAU et al., 1997a). Neste contexto, ressalta-se o interesse em se estudar o efeito das combinações de citocinina e auxina na multiplicação *in vitro* de cebola a partir de segmentos basais.

Segundo RODRIGUES (1994), para viabilizar o processo de micropropagação a partir de explantes secundários (plantas obtidas de meristemas), a indução de bulbificação *in vitro* é necessária não somente para facilitar a transferência de materiais para condições *ex vitro*, como também para o intercâmbio de germoplasma. A indução de bulbificação *in vitro* tem sido amplamente descrita com sucesso, principalmente para o gênero *Allium* sp., em especial para o alho.

O aumento da concentração de sacarose nos meios de cultura de tecidos *in vitro* aumenta o estresse hídrico através do aumento do potencial osmótico do meio, induzindo a bulbificação (RACCA, 1989). Apesar da cebola ser uma cultura propagada via semente, a obtenção de bulbinhos *in vitro* pode ser uma maneira de manter a uniformidade genética de materiais melhorados, principalmente linhas macho-estéreis (ANDREW, 1951).

De acordo com BARKER & MILLS (1980), a concentração de nitrogênio pode influenciar o crescimento e desenvolvimento de muitas espécies de plantas. Altas concentrações podem ser tóxicas e prejudicar o desenvolvimento das plantas; já concentrações moderadas podem aumentar o desenvolvimento das plantas em estádios específicos.

Em cebola é necessário um nível ótimo de nitrogênio para maximizar a produção e a performance da cultura. No entanto, a adição deste macronutriente em excesso, no final do ciclo da cultura, pode limitar a produção, levando à formação de bulbos maiores, com presença de charutos, e aumentar as perdas durante a armazenagem.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agronômico de Campinas - IAC/APTA.

#### 3.1 Micropropagação e Bulbificação de Alho

##### 3.1.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado em todos os experimentos foi o clone IAC 19 obtido por cultura *in vitro* de ápice caulinar da cultivar Lavínia (I-1632) (SIQUEIRA, 1996). Este clone pertence ao grupo dos alhos seminobres com 12 a 20 dentes por bulbo (Portaria nº 264 de 25 de abril de 1989 do Ministério da Agricultura) e se destacou pela maior produtividade e estabilidade de produção (SIQUEIRA, 1996). Os explantes utilizados consistiram de ápices meristemáticos caulinares de 0,3 – 0,5 mm retirados de dentes da referida cultivar.

##### 3.1.2 Assepsia do material (dentes)

Os dentes para todos os experimentos foram desinfetados da seguinte forma:

Primeiramente, os dentes de alho foram descascados, lavados com água e detergente, na pia. Na câmara de fluxo laminar de ar estéril asséptica, os dentes foram cobertos com solução de hipoclorito de sódio comercial e foram deixados por 15 minutos, agitando-se de vez em quando. Depois, os dentes foram enxaguados com solução de água + gotas de ácido clorídrico ( $\text{pH} \pm 3,0$ ) e em seguida com água destilada, ambas autoclavadas. Os dentes esterilizados foram deixados “overnight” no interior de um frasco fechado, umedecido, como em uma câmara úmida.

No dia seguinte, os dentes foram desinfetados mais uma vez em hipoclorito de sódio (mesma concentração), por dez ou 15 minutos (conforme o estado dos dentes). Em seguida foram enxaguados com solução de água + gotas de ácido clorídrico ( $\text{pH} \pm 3,0$ ) e depois com água destilada, ambas autoclavadas. Depois foram desinfetados em 3% de hipoclorito de cálcio (3g em 100 ml) por dez a 15 minutos, agitando-se de vez em quando. Foram enxaguados posteriormente duas vezes, como já descrito. E novamente foram deixados “overnight”.

No terceiro dia, toda a operação do dia anterior foi repetida, mudando-se apenas a concentração de hipoclorito de cálcio para 2%.

### **3.1.3 Isolamento e cultivo dos explantes meristemáticos**

Após a descontaminação, os dentes foram inoculados em frascos (40 ml) contendo solução de Hoagland autoclavada (HOAGLAND & ARNON, 1938), para brotarem e enraizarem sob regime de iluminação artificial em fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro 27/24°C (dia/noite), numa intensidade de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$ . Após o surgimento das raízes e brotamento das folhas, foram retirados os ápices meristemáticos caulinares.

Todos os ápices excisados para todos os experimentos de alho permaneceram inicialmente em meio ½ MS por uma semana no escuro, em pré-cultivo, e depois mais uma semana sob regime de iluminação artificial em fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro 27/24°C (dia/noite) numa intensidade de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$ . Em seguida, os ápices viáveis (não oxidados e sem contaminação aparente) foram transferidos para os tratamentos com diferentes meios de cultura, mantendo-se as condições de iluminação citadas anteriormente. Adotou-se o meio de cultura de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) como básico (ver Anexo 2).

### **3.1.4 Efeito de diferentes concentrações de 6-BA e de elevada dose de sacarose na micropropagação e bulbificação do alho**

Visando testar a capacidade de crescimento de plantas a partir de ápices caulinares de alho, utilizou-se uma variação de concentração da citocinina 6-benzylaminopurina (6-BA), com base no trabalho de ILLG (1990). Empregaram-se as seguintes concentrações de 6-BA: 0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0  $\mu\text{M}$ . O delineamento foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos. Cada tratamento teve dez repetições, sendo um ápice por frasco (40 ml), uma repetição.

Após o crescimento das plantas (aproximadamente 30 dias), estas foram avaliadas quanto ao comprimento (cm) e quanto à massa fresca de folha (g). As plantas foram então transferidas para um novo meio de cultura, visando à indução de bulbificação *in vitro*. Este meio constou do MS completo sem fitorreguladores, suplementado de 60,0  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose, as plantas ficaram neste meio por 30 dias. Após uma semana de cura à temperatura ambiente foram medidas (g) as massas secas dos bulbos obtidos.

### **3.1.5 Efeito da interação entre 6-BA e KIN na micropropagação de alho**

Para o estudo da capacidade de crescimento de plantas a partir de ápices caulinares de alho, testaram-se também as interações entre fitorreguladores e concentrações empregadas, realizando-se experimento com o emprego de duas citocininas. Portanto, como variação de fitorreguladores, optou-se pela combinação, em fatorial (5x5) ou dialética, de diferentes concentrações das citocininas 6-benzylaminopurina (6-BA) e cinetina N6-furfuryladenina (KIN), visando ao crescimento dos ápices caulinares. As combinações em dialelo ou fatorial foram de (6-BA: 0,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0  $\mu\text{M}$ ) x (KIN: 0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0  $\mu\text{M}$ ) totalizando 25 meios de cultura ou tratamentos. O experimento foi conduzido no delineamento estatístico inteiramente casualizado em fatorial (5x5) com 12 repetições por tratamento, sendo que cada frasco (40 ml) continha um ápice, uma repetição, totalizando 300 ápices. Aos 30 dias de cultura no meio de crescimento, as plantas foram avaliadas quanto ao comprimento (cm).

### **3.1.6 Efeito de diferentes níveis de sacarose na bulbificação *in vitro* de alho**

As plantas obtidas no experimento anterior foram transferidas para cinco novos meios de cultura (5 tratamentos) visando à indução de bulbificação *in vitro*. Os meios de cultura utilizados no experimento foram o MS completo com 30,0; 40,0; 50,0; 60,0 e 70,0  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose. Procurou-se distribuir de maneira equitativa as plantas obtidas em cada tratamento do dialélico descrito anteriormente (entre 18 e 30 repetições por tratamento) para os novos meios, com diferentes níveis de sacarose, sendo cada frasco com uma planta, uma repetição. Após 90 dias, avaliou-se: a razão bulbar obtida por meio da divisão do diâmetro do pseudocaulo pelo diâmetro maior do bulbinho; a massa seca e fresca (g); a perda de água (%) dos bulbinhos; a quantidade de plantas que formaram bulbinhos (%); a quantidade de bulbinhos chochos (%) após a cura (secagem à temperatura ambiente) de 40 dias.

### **3.1.7 Efeito de diferentes níveis de sacarose e nitrogênio total na bulbificação *in vitro***

Este experimento objetivou verificar o efeito da concentração dos sais, vitaminas e inositol do meio MS, assim como níveis de sacarose e nitrogênio total (amoniacoal e nítrico) no controle do chochamento dos bulbos causado pela perda de água devido à contínua emissão de brotos e não dormência após a bulbificação *in vitro*.

Para tanto, inocularam-se 200 ápices meristemáticos caulinares em meio MS (força total) suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 5µM de 6-BA.

As plantas obtidas foram distribuídas nos 10 tratamentos (descritos abaixo a-j). Cada tratamento foi constituído de 18 plantas, sendo cada frasco com uma planta transferida uma repetição, no delineamento inteiramente casualizado com 10 tratamentos, totalizando aproximadamente 180 plantas. As condições de ambiente de cultura foram as mesmas adotadas anteriormente. Após o crescimento das plantas (aproximadamente 30 dias), estas foram transferidas para os seguintes meios para bulbificação:

- a) 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + MS
- b) 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + ½ MS (inclusive ½ de vitaminas e ½ inositol)
- c) 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + MS (sem nitrogênio)
- d) 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + ½ MS (sem nitrogênio)
- e) 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + MS
- f) 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + ½ MS (inclusive ½ de vitaminas e ½ inositol)
- g) 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + MS (sem nitrogênio)
- h) 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + ½ MS (sem nitrogênio)
- i) 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + agar-água
- j) 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + agar-água

Após cerca de 60 dias no meio de bulbificação, avaliaram-se as seguintes características:

- a) Escala de notas de folhas/intensidade de necrose e senescência das folhas. Notas de 1 a 4 de acordo com a intensidade de necrose ou senescência das folhas - folhas completamente secas (nota 1), somente a base da planta ainda verde (nota 2), planta somente com a ponta das folhas secas (nota 3) e completamente verdes (nota 4);
- b) Massa (g) da parte aérea;
- c) Massa (g) de bulbos secos (após a cura de 35 dias em condições ambiente).

### **3.1.8 Análises estatísticas**

As análises de variância dos experimentos e os contrastes de médias foram feitos no Programa SANEST (MACHADO & ZONTA, 1995). Utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparações entre as médias. Para variáveis contínuas (concentrações) fez-se também a regressão polinomial para obtenção de equações esperadas, de acordo com a tendência de distribuição dos dados médios originais de

cada tratamento ou concentração empregada. Para os dados médios originais obtidos foram feitos histogramas para melhor visualização dos resultados. A equação adotada de melhor ajuste aos dados médios obtidos em cada característica foi aquela de maior valor do coeficiente de determinação  $R^2$ , em porcentagem. Posteriormente, nas equações quadráticas, estimaram-se as concentrações que resultariam em pontos de máximo valor da característica avaliada somente nos casos onde  $R^2$  ficou acima de 50,0%.

## **3.2 Ginogênese *In Vitro* de Cebola**

### **3.2.1 Material vegetal**

Todo o material vegetal utilizado nos experimentos de ginogênese *in vitro* de cebola foi gentilmente fornecido pela empresa **SAKATA SEED SUDAMERICA LTDA** (fornecidos através de escapo floral com umbelas imaturas). Trata-se de material de interesse ao programa de melhoramento genético da empresa, cujas características individuais estão descritas na tabela 1 no anexo 1.

Para os experimentos de cultura de botões florais foram utilizados os seguintes materiais: 1842; 2519; 2592; AF2500; AF2592; AF1824; AF2753; AF2125; AF2479; 2477; 2684; 2565; 2752; 2510; 2135; 2770; 1494 e 2140.

Para os experimentos de cultura de óvulos utilizou-se: AF2592; 1824; 2783; 2892-15; 2546; 2831-1; 2675; 2840; 2856 e 2831-4.

### **3.2.2 Cultura de botões florais**

#### **3.2.2.1 Influência do genótipo, estágio de desenvolvimento dos botões florais e meios de indução MI1 e MI2 na regeneração *in vitro***

Como material vegetal para este experimento, utilizaram-se três genótipos: 1842 (umbelas fechadas e abertas); 2519 (umbelas fechadas e abertas) e 2592 (umbelas fechadas e abertas).

Umbelas nos estádios “abertas” e “fechadas” foram separadas para utilização neste experimento coletadas ao acaso nas parcelas no Centro Experimental da Empresa. As umbelas foram consideradas nestes estádios quando todos os botões estavam fechados (umbelas fechadas) e quando pelo menos cinco dos botões estavam abertos (abertas). Não houve individualização por genótipo quanto ao estágio de desenvolvimento das umbelas. Mediante isso, os botões de umbelas de diferentes estádios (umbelas abertas e fechadas) foram casualizadas nas placas de Petri ou repetições.

As umbelas selecionadas foram excisadas do escapo floral e passaram pelo seguinte processo de assepsia: as umbelas foram submersas em hipoclorito de cálcio, testando-se as concentrações 1% (1g/100ml), 2% (2g/100ml) e 3% (3g/100ml) por 15 minutos, e posteriormente enxaguadas com solução de água estéril (1 litro) + 5 gotas de ácido clorídrico (1N) e depois com água destilada também estéril.

Os botões florais, já assépticos, foram separados em grandes (0,018 g e/ou  $\geq$  5mm) e médios (0,014 g e/ou  $\geq$  4 mm) e inoculados no seguinte meio de indução (MI1): seguindo protocolo de GEOFFRIAU et al. (1997b) B-5 (ver Anexo 2) modificado com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Após 46 dias no meio de indução MI1, os explantes foram transferidos para meios frescos com a seguinte composição:

MI1 - B-5 com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, suplementado com de 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e

MI2 - B-5 sem fitorreguladores, suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose.

Foram inoculados 20 botões imaturos por placa de Petri, sendo cada placa uma repetição. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado numa disposição fatorial 3x2x2 (3 genótipos; 2 tamanhos de botões e 2 meios de indução), inoculando-se um total de 320 botões para o genótipo 1842, 140 botões para o genótipo 2519 e 240 botões para o genótipo 2592. Inoculou-se um total de 700 botões florais, dos três genótipos citados acima. As quantidades ou repetições para cada genótipo foram diferentes dentro de cada fator de variação, conforme a disponibilidade dos estádios de umbelas e de botões no momento da realização do experimento. Os botões florais permaneceram sob regime de iluminação artificial em fotoperíodo de 16 horas de luz numa intensidade de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$  e 8 horas de escuro 27/24°C (dia/noite).

Decorridos 90 dias, avaliaram-se os seguintes parâmetros:

a) rendimento de calo = número de botões florais com formação de calos pelo número de ovários inoculados (viáveis) x 100;

b) crescimento de calos (escala comparativa de notas de acordo com o estágio no momento da avaliação) = média ponderada das notas;

c) rendimento de embriogênese = número de calos com regeneração de plantas pelo número total de ovários inoculados x 100;

d) rendimento de plantas = número de plantas regeneradas pelo número de calos obtidos.

Efetuu-se análise estatística da variância com testes de médias por meio de Duncan a 5% de probabilidade e gráficos de histogramas para as características avaliadas.

### **3.2.2.2 Efeito de genótipo, tamanho de botões florais, meios de indução e tempo de exposição no meio de indução na regeneração *in vitro***

Assim que chegaram ao laboratório, foram armazenadas em geladeira (4° - 8° Celsius), para manutenção da capacidade ginogênica, umbelas fechadas e abertas, como especificado anteriormente, de 15 genótipos: AF2500 (umbelas fechadas e abertas); AF2592 (umbelas fechadas e abertas); AF1824 (somente umbelas abertas); AF2753 (umbelas fechadas e abertas); AF2125 (somente umbelas abertas); AF2479 (somente umbelas abertas); 2477 (somente umbelas fechadas); 2684 (somente umbelas fechadas); 2565 (somente umbelas abertas); 2752 (somente umbelas abertas); 2510 (umbelas fechadas e abertas); 2135 (somente umbelas fechadas); 2770 (somente umbelas fechadas); 1494 (somente umbelas fechadas) e 2140 (somente umbelas fechadas).

A assepsia das umbelas imaturas seguiu o protocolo adotado no experimento anterior, utilizando a concentração de hipoclorito de cálcio a 3% .

Os botões florais de cada umbela já asséptica foram divididos em pequenos (0,012 g e/ou  $\geq 3$  mm), médios (0,014 g e/ou  $\geq 4$  mm) e grandes (0,018 g e/ou  $\geq 5$  mm), como fator qualitativo de estágio de desenvolvimento floral.

A seguir, os botões foram retirados das umbelas no interior da câmara de fluxo laminar e inoculados em meio sólido de pré-cultura:  $\frac{1}{2}$  MS, ou seja, MS com metade da concentração de sais inorgânicos, suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose.

As placas de Petri contendo os explantes foram mantidas sob luz por 16 horas numa intensidade de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$  e no escuro por 8 horas a 27/24°C (dia/noite). Após sete dias, os botões florais viáveis e sadios (sem contaminação aparente) dos 15 genótipos foram transferidos para o seguinte meio de indução para divisão celular: MI1 B-5 com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, suplementado com 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e ainda os genótipos 2753; 2752; 2592 também foram inoculados no meio MI3, que se constituiu no mesmo meio de indução MI1, porém suplementado com 500 mg.L<sup>-1</sup> de espermina.

Foram inoculados 20 botões imaturos de cada estágio por placa de Petri, sendo cada placa uma repetição, num total de 15 placas e 300 botões por tratamento, para cada genótipo.

Sete, catorze e vinte e um dias após a inoculação nos meios de indução (MI1 e MI3), foram feitas repicagens em série para meios de cultura (MI2) B-5 sem fitorreguladores e com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (perfazendo os diferentes tempos em meio de indução) em todos os tratamentos. Além disso, houve mais um tratamento que permaneceu continuamente em MI1 e MI3 (contínuo). Como controle foi adotado o método utilizado no experimento anterior, que foi o de 45 dias em meio de indução (MI1 ou MI3), seguido para meio de cultura (MI2) sem fitorregulador e suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> sacarose.

O delineamento foi inteiramente casualizado numa disposição fatorial 15x3x5 (15 genótipos, três tamanhos de botões, cinco dias de exposição no meio).

Após 90 dias, avaliou-se o desenvolvimento dos calos (escala de notas), frequências de calos, regeneração e vitrificação dos botões florais.

Para avaliar o desenvolvimento de calos nos botões florais dos genótipos utilizou-se uma escala de notas crescentes, da seguinte maneira:

Nota 1 - sem formação aparente de calos; Nota 2 - início de crescimento; Nota 3 - formação de calos de tamanho próximo ao do botão floral e Nota 4 - predominância de calos em relação ao explante.

Para a presença de hiper-hidricidade (vitrificação), chegou-se à taxa ou frequência, em porcentagem, da seguinte forma:

$$\text{TAXA DE VITRIFICAÇÃO/PLACA: } \frac{\text{N}^{\circ} \text{ DE BOTÕES VITRIFICADOS}}{20 \text{ (TOTAL POR PLACA)}} \times 100$$

Todas as plantas regeneradas foram transferidas para frascos contendo 40ml de meio MS (ver Anexo), para enraizamento e posterior contagem cromossômica, e foram feitas repicagens, em série, a cada 28 dias para o mesmo meio.

### 3.2.3 Análise cromossômica

O número cromossômico foi determinado através do preparo de lâminas sob microscópio óptico OLYMPUS e ZEISS de contraste de fase, utilizando-se células do meristema radicular das plantas regeneradas a partir de botões florais durante a fase de propagação *in vitro*. Inicialmente, testaram-se diferentes bloqueadores de divisão e

corantes em diferentes tempos e chegou-se ao seguinte protocolo: para bloquear o ciclo de divisão celular na fase da metáfase foi utilizado, como pré-tratamento, o antimetabólico 8 HQ (8-hidroxiquinoleína 0,002 M), onde as raízes ficaram imersas por quatro horas e meia, a temperatura ambiente. O material foi fixado em Carnoy 3:1 (3 partes de álcool etílico P.A. para 1 parte de Ácido Acético Glacial) onde as raízes das plantas regeneradas ficaram por no mínimo 30 minutos. Para que as substâncias corantes permeassem os cromossomos, os tecidos foram hidrolisados, facilitando o esmagamento e a remoção das paredes das células na lâmina. Para isso, o material foi lavado com água destilada e hidrolisado na enzima pectinase 20% a 37°C por 30 minutos. Após a digestão enzimática, as raízes tiveram os meristemas (coifa) colocados em ácido acético 45% e foram mantidos em geladeira. O esmagamento do material foi feito pingando-se uma gota de ácido acético 45% sem corante. A coloração foi feita depois com o corante Giemsa 2% por 5 minutos.

#### **3.2.4 Análise com isoenzimas**

Para diferenciação das plantas duplo-haplóides (homozigotas) e diplóides (heterozigotas) foram feitas análises isoenzimáticas baseadas nos protocolos de BOHANEK et al. (1995); SAWAZAKI (1995) e HOU et al. (2001).

Inicialmente, testaram-se diferentes géis, tampões de eletroforese e 11 sistemas enzimáticos até se obter o seguinte protocolo eficiente: as folhas ou bulbos foram manuseados em condição de temperatura ao redor de 4°C, de modo a evitar a degradação das enzimas e manter a atividade das enzimas oxidativas e hidrolíticas baixa. Um grama de tecido (folha ou bulbo) de cada amostra foi macerado em almofariz em nitrogênio líquido com 1,5 ml de tampão de extração gelado [50mM de tris-HCl pH 7,5; 5% glicerol, 14nM  $\beta$ - mercaptoetanol (0,1% v/v); 0,1% triton X-100]. Para homogeneização, essa solução foi colocada em ependorfes numerados e pareados de acordo com a quantidade de solução, para que fossem centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida, 40  $\mu$ l foram retirados do sobrenadante e colocados nos poços do gel (ver Anexo 1). Acrescentou-se tampão Glicina (Tampão do eletrodo Glicina 3x concentrado sem SDS [tris – 9g e glicina 43,2g]), diluído na proporção de uma parte em 2 de água, utilizando-se o aparelho eletroforético vertical mini da BioRad (Protean II) em 2 géis com 2 mm de espessura. A corrida eletroforética foi feita a 10°C por 1h sob corrente de 100mA.

Os sistemas de reação enzimática para coloração das bandas foram realizados de acordo com SAWAZAKI (1995) e WENDEL & WEEDEN (1989) (ver Anexo 1) e foram utilizados os sistemas que nos testes preliminares forneceram bons padrões de bandas: EST, GOT, G<sub>6</sub>PDH e MDH. Os géis foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente ou até as bandas aparecerem. Então foram lavados com água corrente e fixados (para 100 ml: 50 ml álcool metílico; 10 ml ácido acético e 40 ml água) por 15 minutos e lavados novamente em água corrente e deixados mais 15 minutos em Glicerol (para 100 ml: 50 ml glicina e 50 ml água).

Quando para pelo menos um sistema a planta analisada apresentou dois alelos por locus, esta foi considerada heterozigota e foi descartada. Se para todos os sistemas testados a planta apresenta-se apenas uma banda por locus, esta seria considerada homozigota ou duplo-haplóide espontânea.

### **3.2.5 Cultura de óvulos**

Novamente, assim que chegaram ao laboratório, foram armazenadas em geladeira (4° - 8° Celsius) para manterem a capacidade de ginogênese, umbelas fechadas e abertas, como especificado anteriormente, de 10 genótipos: 2592 (umbelas fechadas e abertas); 2892-15 (somente umbelas abertas); 2753 (umbelas fechadas e abertas); 2546 (umbelas fechadas e abertas); 2675 (somente umbelas fechadas); 1824 (umbelas fechadas e abertas); 2831-1 (somente umbelas abertas); 2840 (umbelas abertas e fechadas); 2831-4 (umbelas abertas e fechadas); 2856 (umbelas fechadas e abertas).

Umbelas excisadas do escapo floral foram desinfetadas em hipoclorito de cálcio a 3% por 20 minutos, e enxaguadas com solução de água estéril (1 litro) + 5 gotas de ácido clorídrico (1N) e depois com água destilada também estéril por 10 minutos.

Como a quantidade de umbelas abertas e fechadas não foi igual (ao acaso), foi feita uma mistura dos dois tipos, que foram casualizados para a retirada dos botões, que já assépticos, foram separados em grandes (0,018 g e/ou  $\geq 5$  mm), médios (0,014 g e/ou  $\geq 4$  mm) e pequenos (0,012 g e/ou  $\geq 3$  mm).

Os óvulos foram retirados dos botões com auxílio de lupa. Foram inoculados seis óvulos (quantidade de óvulos por botão floral) por placa como teste, depois se aumentou esse número para 30 por placas, adotando-se para todos os demais experimentos 48 óvulos por placa (óvulos de oito botões florais) quando se notou a baixa taxa de contaminação.

Após isolamento, os óvulos foram inoculados nos seguintes meios:

A) B-5 modificado com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado;

B) idem ao meio A sem carvão ativado;

C) idem ao meio A, com 5g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e sem ágar (meio líquido);

D) idem ao meio A, mas sem carvão ativado e sem ágar (meio líquido);

E) idem ao A, com 5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado ao invés de 2 g.L<sup>-1</sup>;

F) B-5 com 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar, e o dobro de vitaminas (10ml de tiamina HCl, 1ml de piridoxina HCl e 1ml de ácido nicotínico);

G) idem ao meio F, com 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado;

H) idem ao F, contendo 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup>;

I) idem ao meio F, com 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup>.

As placas de Petri com 25 ml de meio contendo os óvulos foram mantidas em sala de crescimento sob luz por 16 horas numa intensidade de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$  e no escuro por 8 horas a 27/24°C (dia/noite) ou somente no escuro sob a mesma temperatura.

Foram inoculados então 48 óvulos por placa, sendo cada placa uma repetição. Para todos os genótipos foram testados os três tamanhos de botão (pequenos, médios e grandes). Cada genótipo seguiu um tratamento diferente (presença e ausência total de luz; meios de a-i).

Os óvulos ficaram nesse mesmo meio até produzirem embrião ou calo (entre 30 e 120 dias), quando foram transferidos para frascos contendo 40 ml de meio MS (ver Anexo 1) e foram feitas repicagens em série a cada 28 dias para o mesmo meio.

A avaliação de todos os experimentos foi feita aos 60 e 90 dias, pois, segundo a literatura, é quando se obtém maior taxa de embriogênese (JAKŠE et al., 1996; MARTINEZ et al., 2000). Porém, devido à baixa ocorrência de calos e regeneração aos 60 dias, foram consideradas apenas as avaliações feitas aos 90 dias.

Para a avaliação foram dadas notas para crescimento de óvulos (de 1 a 4) sendo: Nota 1) ausência de crescimento; Nota 2) início de crescimento até 1/3; Nota 3) entre 1/3 e 2/3 e Nota 4) dobro de crescimento.

Também foi adotada uma escala de cor (branca, creme e marrom) baseada no trabalho de KELLER (1990), sendo branco o óvulo que não teve alteração de cor; creme

o óvulo com ½ de escurecimento e marrom totalmente escurecido com aparência de oxidação. Avaliou-se ainda a presença ou não de calos e embriões.

As análises de variância dos experimentos e os contrastes de médias foram feitos no Programa SANEST (MACHADO & ZONTA, 1991). Utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparações entre as médias. Para os dados médios originais obtidos foram feitos histogramas para melhor visualização dos resultados.

### **3.3 Micropropagação e Bulbificação *In Vitro* de Cebola**

#### **3.3.1 Micropropagação *in vitro***

Para os experimentos de micropropagação a partir de discos basais e posterior bulbificação *in vitro* das plantas obtidas, foram utilizados os seguintes materiais de bulbos: 1824; 2696; 2698; 2778; 2882 e de bulbinhos: 2948; 2483; 2954; 2690; 2917.

A assepsia foi baseada no protocolo de RODRIGUES (1994), com algumas modificações, como pode ser visto a seguir:

1. Secção a aproximadamente 20 mm de altura da base;
2. Imersão em solução de detergente comercial (20 gotas.L<sup>-1</sup>) por 30 minutos;
3. Corte das túnicas nas laterais da superfície pré-cortada, eliminado os tecidos de reserva e corte das raízes;
4. Imersão em fungicida Chlorotalonyl (6 ml.L<sup>-1</sup>) por 2 horas (essa etapa sofreu modificações ao longo dos experimentos);
5. Na câmara de fluxo laminar horizontal, os discos basais foram imersos em solução de hipoclorito de cálcio 2% (2 g em 100 ml) por 30 minutos (essa etapa também sofreu modificações ao longo dos experimentos);
6. Enxágue em duas vezes com solução de água estéril (1 litro) + 5 gotas de ácido clorídrico (1N) e,
7. Enxague (uma vez) com água destilada também estéril.

Como essa desinfecção não mostrou ser eficiente (taxa de contaminação acima de 50,0%), são descritas a seguir as outras 8 desinfecções testadas.

1) Desinfecção com 2% de hipoclorito de cálcio por 30 minutos e 2 horas no fungicida Chlorotalonil (6 ml.L<sup>-1</sup>) para o genótipo 1824 (bulbo).

2) Desinfecção com 2% de hipoclorito de cálcio por 30 minutos e 3 horas no fungicida Chlorotalonil (6 ml.L<sup>-1</sup>), para os genótipos 2882 (bulbo) e 2696 (bulbo).

3) Desinfecção com 3% de hipoclorito de cálcio por 30 minutos e 3 horas no fungicida Chlorotalonil ( $6 \text{ ml.L}^{-1}$ ), para os genótipos 2882; 1824; 2696; 2698 e 2778 (bulbos).

4) Desinfecção com 3% de hipoclorito de cálcio por 30 minutos e 4 horas no fungicida Chlorotalonil  $6 \text{ ml.L}^{-1}$ , para os genótipos 2698 e 2778 (bulbos).

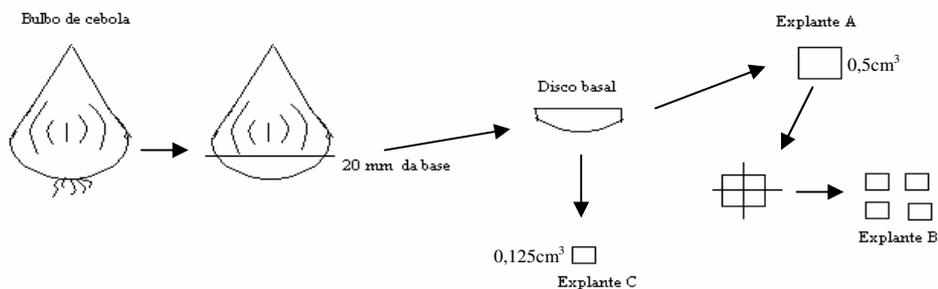
5) Desinfecção com 3% de hipoclorito de cálcio por 45 minutos e 4 horas no fungicida Chlorotalonil  $6 \text{ ml.L}^{-1}$ , para o genótipo 2690 (bulbinho).

6) Desinfecção com 3% de hipoclorito de cálcio por 45 minutos e 4 horas no fungicida Chlorotalonil ( $6 \text{ ml.L}^{-1}$ ) e Oxicleto de Cobre ( $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ), para o genótipo 2483 (bulbinho).

7) Desinfecção com 3% de hipoclorito de cálcio por 45 minutos e 4 horas no fungicida Chlorotalonil ( $6 \text{ ml.L}^{-1}$ ), Oxicleto de Cobre ( $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) e antibiótico Rifampicina ( $300 \text{ ml.L}^{-1}$ ) para o genótipo 2954 (bulbinho).

8) Desinfecção com 3% de hipoclorito de cálcio por 45 minutos e 4 horas no fungicida Chlorotalonil ( $6 \text{ ml.L}^{-1}$ ) e Oxicleto de Cobre ( $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ). Observação: meios MSg, MSh, MSi acrescidos de  $0,075 \text{ mg.L}^{-1}$  de Chlorotalonil (uso de massa ao invés de volume) e  $250 \text{ ml.L}^{-1}$  de antibiótico Rifampicina ( $300 \text{ ml.L}^{-1}$ ), para os genótipos 2917 e 2948 (bulbinhos).

Após o tratamento de assepsia dos discos basais, estes foram cortados em segmentos (explantes), retirando-se os tecidos danificados devido à solução desinfetante. O tamanho final do explante viável ficou aproximadamente de  $0,5 \text{ cm}^3$  (explante A). Um outro tamanho de explante também foi obtido com o seccionamento longitudinal do segmento A em quatro partes iguais (explante B) (Figura 1). Os explantes foram inoculados em placas de Petri com 30 ml de meio, inoculando-se um explante A por placa ou as quatro partes do explante B por placa. Todos os explantes (A e B) ficaram sob luz por 16 horas numa intensidade de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$  e no escuro por 8 horas a  $27/24^\circ\text{C}$  (dia/noite).



**Figura 1** – Esquema dos diferentes tipos de explantes obtidos de discos basais de bulbos (A, B) e bulbinhos (C) de cebola.

Foram inoculados de 1 a 2 explantes (explante A) e de 4 a 8 explantes (explante B), para cada meio de cultura (MS1, MS2, MS3) de acordo com a quantidade disponível para cada um dos 5 genótipos dos bulbos, sendo um tipo de explante (A ou B) por placa, uma repetição.

Para micropropagação utilizou-se o meio MS (ver Anexo 1), modificado pela adição da metade da concentração das vitaminas e suplementado com três diferentes concentrações de 6-BA em combinação com uma concentração da auxina NAA. Totalizando três meios diferentes (MS1, MS2, MS3) como pode ser visto a seguir:

1. MS1=1,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de NAA;
2. MS2=2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de NAA;
3. MS3=4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de NAA.

O explante utilizado foi o (C) (Figura 1) para os bulbinhos, devido ao reduzido tamanho (0,125cm<sup>3</sup>), sendo inoculados no meio MS com metade das vitaminas e com as seguintes composições de fitorreguladores:

- a) MSa - 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de NAA;
- b) MSb - 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de NAA;
- c) MSc - 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de NAA;
- d) MSd - 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de NAA;
- e) MSe - 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de NAA;

- f) MSf - 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de NAA;
- g) MSd - 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de NAA acrescidos de 0,075 mg.L<sup>-1</sup> de Chlorotalonil e 250 ml.L<sup>-1</sup> de antibiótico Rifampicina (300 ml.L<sup>-1</sup>);
- h) MSe - 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de NAA acrescidos de 0,075 mg.L<sup>-1</sup> de Chlorotalonil e 250 ml.L<sup>-1</sup> de antibiótico Rifampicina (300 ml.L<sup>-1</sup>);
- i) MSf - 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de NAA acrescidos de 0,075 mg.L<sup>-1</sup> de Chlorotalonil e 250 ml.L<sup>-1</sup> de antibiótico Rifampicina (300 ml.L<sup>-1</sup>).

Para os 5 genótipos de bulbinhos, foram inoculados de 4 a 5 explantes (C), para cada um dos 9 meios de cultura (Mas, MSb, MSc, MSd, MSf, MSg, MSh, MSi) de acordo com a disponibilidade de cada genótipo, sendo um explante (C) por placa, uma repetição.

Após 60 dias nos meios de micropropagação (MS1, MS2, MS3, MS4, MSa, MSb, MSc, MSd, MSf, MSg, MSh, MSi) foram feitas avaliações para observar a taxa (%) de contaminação.

### **3.3.2 Bulbificação *in vitro***

As plantas regeneradas, para todos os 10 genótipos de cebola testados (5 bulbos e 5 bulbinhos), que não contaminaram foram transferidas após 65 dias para frascos com 40 ml de meio de cultura para indução de bulbificação, com base no trabalho de RODRIGUES, 1994, com as seguintes composições:

- A. CONTROLE – MS (30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose)
- B. MS– 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose
- C. MS – 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose
- D. MS – 120 g.L<sup>-1</sup> de sacarose

Após 30 dias nos meios de bulbificação (MS: A, B, C, D) foram feitas avaliações para observar a taxa (%) de bulbificação.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Micropropagação e Bulbificação de Alho

#### 4.1.1 Efeito de diferentes concentrações de 6-BA e de elevada dose de sacarose na micropropagação e bulbificação do alho

Os resultados de crescimento de planta a partir da cultura *in vitro* de ápice caulinar do clone IAC 19 (Lavínia I-1632), em doses crescentes de 6-BA, e de bulbificação após transferência das plantas para meio de cultura com 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose encontram-se na tabela 2.

**Tabela 2** - Médias das características avaliadas em cinco meios de cultura, variando a concentração (doses em µM) do fitorregulador 6-BA, com posterior transferência para sacarose (60 g.L<sup>-1</sup>).

Meios: 6-BA	Nº Rep.	Comp. Planta <sup>(1)</sup>	Tukey 5%	Nº Rep.	Massa Folha <sup>(2)</sup>	Tukey 5%	Nº Rep.	Massa Bulbo <sup>(3)</sup>	Tukey 5%
0,0	10	4.52	a <sup>(4)</sup>	10	0.08	a	7	0.06	a
5,0	10	15.98	b	10	1.21	b	12	1.09	b
10,0	10	13.68	b	10	0.84	b	13	0.69	ab
20,0	10	14.88	b	10	0.99	b	4	0.90	ab
40,0	10	14.41	b	10	0.92	b	3	0.50	ab

Nº = número; Rep = repetição e Comp = comprimento (cm). <sup>(1)</sup>Coefficiente de Variação experimental - CV(%) = 18.3; <sup>(2)</sup>CV(%) = 17.9; <sup>(3)</sup>CV(%) = 15.2. <sup>(4)</sup>Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

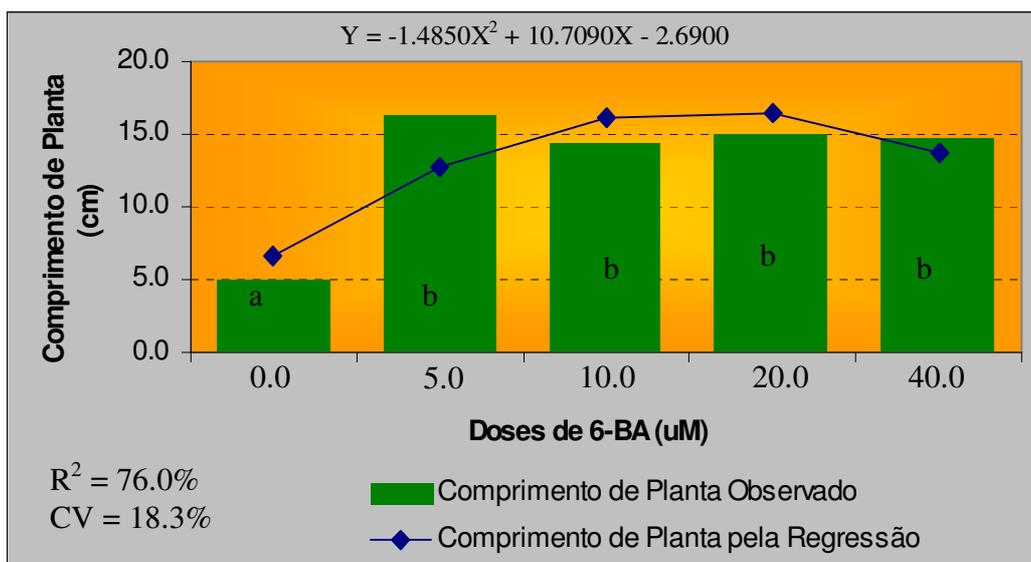
Embora não diferindo entre si, todas as doses do fitorregulador promoveram maior crescimento da planta (praticamente 4x), diferindo significativamente do meio de cultura com ausência de 6-BA. A mesma tendência foi observada para massa de folhas. A concentração indicada para desenvolvimento de ápice caulinar nas condições do presente experimento deve ser a menor por questões de custo e também para evitar riscos de vitrificação ou hiper-hidricidade dos explantes, muito comum com o uso de altas concentrações deste fitorregulador (IVANOVA et al., 2006). Em trabalhos semelhantes, com ápice caulinar da cultivar seminobre Amarante, apesar do explante estar determinado e competente para desenvolvimento (KERBAUY, 1999), também

houve necessidade da adição de fitorreguladores como isopentenyladenina (2-ip), ácido indolbutírico (AIB) ou ácido  $\alpha$  naftaleno acético (NAA), (ILLG & SIQUEIRA, 1986; MORICONI et al. 1990 e TORRES et al. 2000).

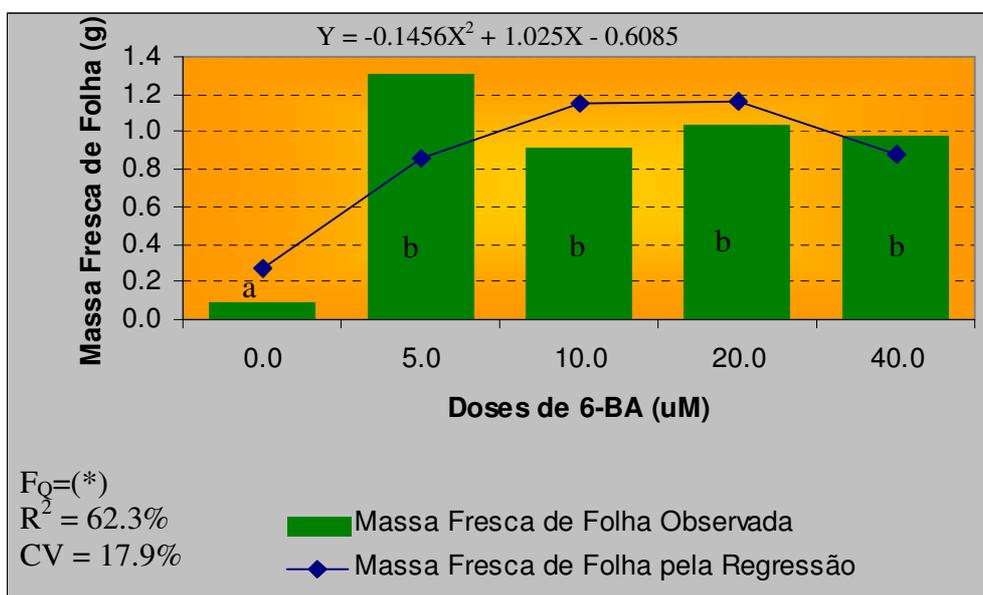
Verificamos ainda que quanto à massa de bulbo ou bulbinho obtida a partir de uma semana de cura, em condições ambientes, a menor concentração de 6-BA (5 $\mu$ M) foi a única que diferiu estatisticamente da ausência deste fitorregulador. As demais concentrações não diferiram entre si e tampouco do controle sem fitorregulador, em que a massa de bulbo foi muito baixa.

Nas Figuras 2 a 4 são apresentadas as tendências dos dados observados como equações quadráticas. Os valores de  $R^2$  foram de 62,3% para massa fresca de bulbinhos (Figura 3) e 76,0% para comprimento de plantas (Figura 2). Estes resultados evidenciaram que os efeitos de concentrações de 6-BA nos desvios da linha de tendência da equação quadrática são predominantes em relação aos efeitos de ambiente (erro experimental), que no caso foi satisfatório (CV% entre 17,0 e 18,5). Valores elevados de  $R^2$ , acima dos obtidos neste trabalho, mas também de natureza quadrática, foram encontrados por YURI et al. (2004) para massa fresca total de plantas ( $R^2=81,8\%$ ) e de bulbinhos ( $R^2=87,8\%$ ), ou seja, apesar de  $R^2$  ter sido mais alto que em nosso estudo, a probabilidade de erro experimental também foi maior. Já na figura 4 observou-se o inverso: para massa seca de bulbinho, o valor de  $R^2$  (31,7%) foi baixo e o CV% de 15,2 também foi baixo, indicando baixo efeito de ambiente.

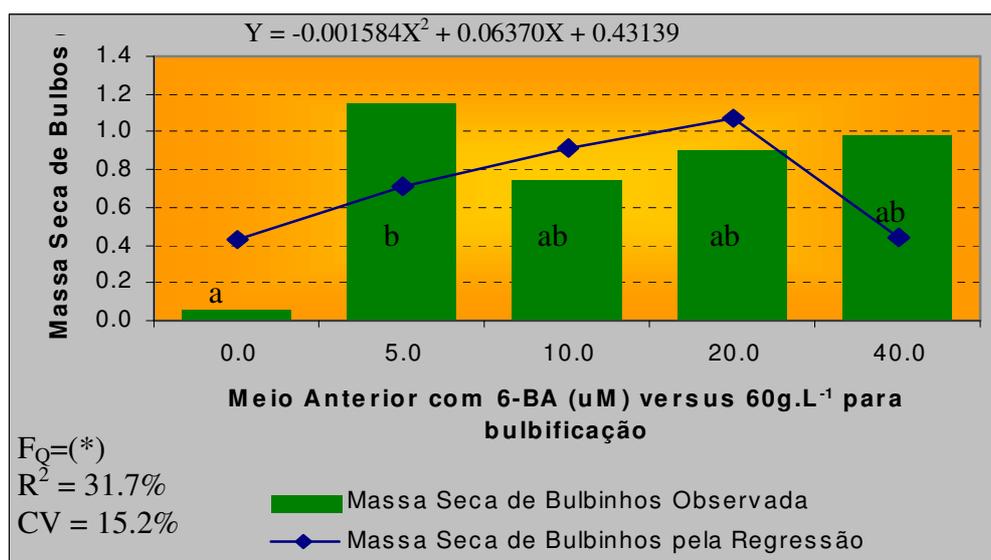
Concluiu-se, portanto, que deve ser recomendada a concentração de 5 $\mu$ M de 6-BA para crescimento de ápice caulinar e posterior bulbificação.



**Figura 2** – Valores de comprimento de folha (cm) observados e pela regressão para as concentrações (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 $\mu$ M) de 6-BA testadas visando ao crescimento de ápices caulinares.



**Figura 3** – Valores de massa fresca de folha (g) observados e pela regressão para as concentrações (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 $\mu$ M) de 6-BA testadas visando ao crescimento de ápices caulinares.



**Figura 4** – Valores de massa seca de bulbinhos (g) observados e pela regressão para as concentrações (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 $\mu$ M) de 6-BA testadas visando ao crescimento de ápice caulinar, após transferência para meio de bulbificação.

Na tabela 3, encontram-se os valores médios de taxa de bulbificação e de chochamento nas diferentes concentrações de 6-BA. As concentrações entre 5 e 20  $\mu$ M apresentaram valores próximos (36,0 a 43%). A concentração máxima de 6-BA apresentou o maior nível de chochamento, com 80,0%. Como no controle não houve chochamento, pode-se inferir que o 6-BA, de alguma forma, interferiu no processo de perda de água dos bulbinhos. Apesar dos bulbos apresentarem menor taxa de chochamento na ausência do 6-BA, a adição deste fitorregulador promoveu um aumento da massa dos bulbinhos, como salientado anteriormente (Tabela 2). Em 5,0  $\mu$ M de 6-BA atingiu-se 100,0% de plantas que apresentaram desenvolvimento de bulbinhos. Após a transferência destes bulbinhos para o mesmo meio de cultura só que suplementado com maior concentração de sacarose (60 g.L<sup>-1</sup>), observou-se 41,7% de chochamento ou 58,3% de bulbos viáveis (não chochos). Em comparação com os outros tratamentos, nota-se que este (5  $\mu$ M de 6-BA) foi o que resultou em maior percentual de bulbos viáveis. YURI et al. (2004) obteve o valor máximo de 79,3% de produção de bulbinhos com a cv Caçador.

**Tabela 3** – Porcentagem de bulbificação e de chochamento de bulbinhos em cinco concentrações de 6-BA ( $\mu\text{M}$ ) seguida de transferência para meio com sacarose.

6-BA	Sacarose	% Bulbificação	% Chochamento	% bulbos viáveis
0,0	60,0	47,1	0,0	47,1
5,0	60,0	100,0	41,7	58,3
10,0	60,0	91,7	36,4	63,6
20,0	60,0	63,6	42,9	57,1
40,0	60,0	33,3	80,0	20,0

Resultados após transferência para meio com alta concentração de sacarose ( $60\text{g.L}^{-1}$ ), são importantes do ponto de vista prático, pois a produção *in vitro* de bulbinho, evita as perdas, muito comuns, durante a aclimação de plantas, além de favorecer o intercâmbio de germoplasma (YASSEN et al., 1993; ILLG, 1995). Além disso, pode-se desenvolver protocolos que visem à exploração da variação somaclonal e de transformação genética, tendo em vista que as plantas assim obtidas são mantidas após o processo de bulbificação *in vitro*.

#### 4.1.2 Efeito da interação entre 6-BA e KIN na micropropagação de alho

No experimento envolvendo outra citocinina (KIN) em combinação com 6-BA (cinco concentrações), verificou-se a presença de interação altamente significativa (F a 1%) entre os fitorreguladores e significância (F a 5%) somente para efeito de KIN. Não houve efeito, portanto, para as concentrações de 6-BA. Na tabela 4 são apresentados os contrastes de médias para a variável comprimento de planta nos 25 tratamentos do dialélico. A amplitude de variação foi de 2,08 cm, com os maiores valores (embora não significativos entre si) ficando entre 5,06 e 5,39 cm correspondendo, respectivamente ao tratamento T4 (25  $\mu\text{M}$  de 6-BA e 0,0  $\mu\text{M}$  de KIN) e T6 (5,0  $\mu\text{M}$  de KIN sem 6-BA). Muito embora o melhor meio de cultura tenha sido aquele que envolveu somente a KIN (25  $\mu\text{M}$ ) este não diferiu de todas as demais combinações que apresentaram valores de comprimento de planta acima de 3,85 cm (Tabela 4). Desta forma, pode-se indicar diferentes meios de cultura com as citocininas isoladas ou em combinação para

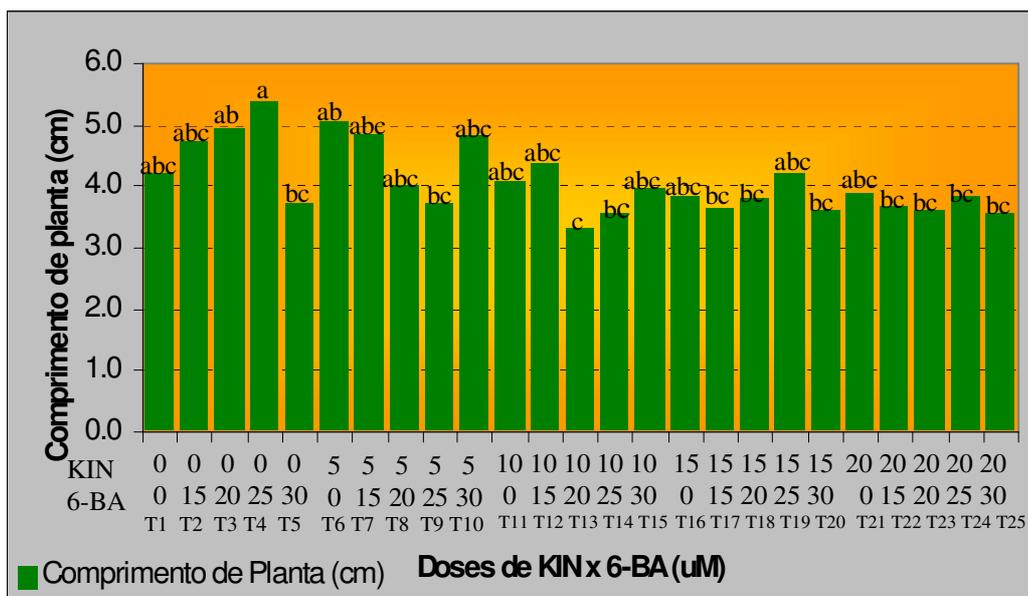
crescimento de planta a partir de ápices caulinares do clone seminobre (Lavínia 1632, clone IAC 19). Também é preciso salientar que, nas condições deste experimento, a ausência das duas citocininas (controle) apresentou semelhança estatística com os meios de melhores respostas mencionados. Vale lembrar também que ápices caulinares possuem competência e determinação para crescimento, desde que sejam fornecidas as condições necessárias de nutrição e luminosidade. Auxinas e citocininas endógenas são sintetizadas pelos primórdios foliares dos ápices caulinares e radícula, respectivamente, e podem suprir a demanda para crescimento e enraizamento (KERBAUY, 1999). Seria importante verificar a taxa de bulbificação, de massa de bulbinho e de chochamento na etapa posterior de bulbificação numa determinada concentração de sacarose, mantendo-se, portanto, a identidade do meio anterior. Entretanto, pelo elevado número de plantas que demandaria um fatorial deste tipo, optamos pela distribuição equitativa das 12 plantas obtidas em cada um dos 25 tratamentos anteriores, testando-se então cinco concentrações de sacarose para bulbificação, ao invés de uma como seria no fatorial.

**Tabela 4** – Médias de comprimento de planta para 25 diferentes tratamentos em dialélico envolvendo cinco concentrações de duas citocininas: KIN ( $\mu\text{M}$ ) e 6-BA ( $\mu\text{M}$ ).

Tratamento	Meios de Cultura		Nº de Repetições	Comprimento de Planta (cm) <sup>(1)</sup>	5% <sup>(2)</sup>
	KIN	6-BA			
T1	0	0	12	4.20	abc
T2	0	15	12	4.74	abc
T3	0	20	12	4.95	ab
T4	0	25	12	5.39	a
T5	0	30	12	3.73	bc
T6	5	0	12	5.06	ab
T7	5	15	12	4.85	abc
T8	5	20	12	4.00	abc
T9	5	25	11	3.71	bc
T10	5	30	12	4.80	abc
T11	10	0	11	4.10	abc
T12	10	15	12	4.36	abc
T13	10	20	12	3.31	c
T14	10	25	12	3.56	bc
T15	10	30	12	3.98	abc
T16	15	0	12	3.85	abc
T17	15	15	12	3.66	bc
T18	15	20	12	3.80	bc
T19	15	25	10	4.23	abc
T20	15	30	11	3.62	bc
T21	20	0	12	3.90	abc
T22	20	15	11	3.70	bc
T23	20	20	11	3.62	bc
T24	20	25	12	3.83	bc
T25	20	30	12	3.57	bc

Kin = kinetina. <sup>(1)</sup>CV(%) = 25.5. <sup>(2)</sup>Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Na figura 5 foi feito um histograma contendo os 25 tratamentos do dialélico 6-BA x KIN para a variável comprimento de planta. Pelo histograma nota-se claramente a pequena oscilação entre as concentrações empregadas. O meio de cultura que proporcionou menor valor de comprimento (3,31 cm) foi o correspondente ao tratamento T13 (10,0  $\mu$ M de KIN e 20,0  $\mu$ M 6-BA) que diferiu estatisticamente apenas do tratamento que proporcionou maior valor de comprimento de planta T4 (5,39 cm).

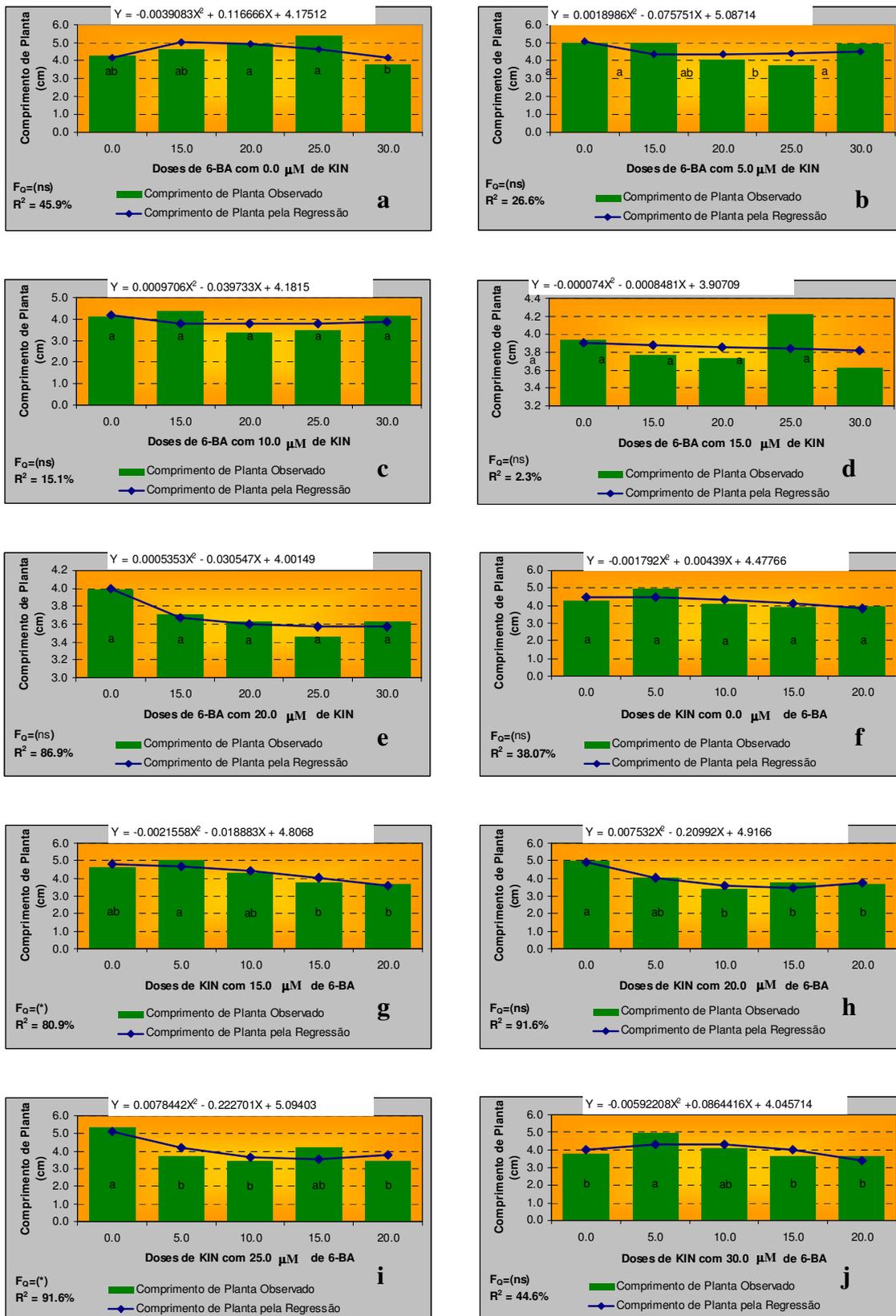


**Figura 5** – Comprimento de planta observado para cada combinação de KIN e 6-BA: T1 (0;0); T2 (0;15); T3 (0;20); T4 (0;25); T5 (0;30); T6 (5;0); T7 (5;15); T8 (5;20); T9 (5;25); T10 (5;30); T11 (10;0); T12 (10;15); T13 (10;20); T14 (10;25); T15 (10;30); T16 (15;0); T17 (15;15); T18 (15;20); T19 (15;25); T20 (15;30); T21 (20;0); T22 (20;15); T23 (20;20); T24 (20;25); T25 (20;30).

Em função de haver interação entre as duas citocininas ( $F^{**}$ ) para comprimento de planta foram realizados desdobramentos de graus de liberdade para comparações, fixando-se uma dada concentração de uma citocinina e variando-se as concentrações da outra citocinina correspondente.

A figura 6a-j apresenta cada caso específico com as respectivas equações de melhor ajuste dos dados originais. Os valores de  $R^2$  das equações quadráticas variaram de 2,3% a 91,6%, sendo que foram discutidos somente os tratamentos que proporcionaram valores acima de 40,0%. A figura 6a apresentou o valor de  $R^2$  igual a 45,9% e a combinação de maior valor de comprimento de planta (5,39), já mencionado

anteriormente foi o T4 com 25  $\mu\text{M}$  de 6-BA e 0,0 de KIN. A regressão de melhor ajuste dos dados dentro deste estrato de desdobramento foi quadrática, cujo ponto de máximo, foi para 15  $\mu\text{M}$  de 6-BA. O baixo valor de  $R^2$  obtido prejudica a adoção segura deste meio de cultura visando crescimento *in vitro* de ápice caulinar. Por outro lado, a concentração de 20  $\mu\text{M}$  de KIN na ausência de 6-BA (T21) resultou no valor de 86,9% de  $R^2$  (Figura 6e), propiciando melhor confiabilidade na indicação deste meio de cultura, apesar do teste de Tukey apresentar-se não significativo (Tabela 4). Concentrações maiores de KIN mostraram-se prejudiciais ao crescimento da planta na ausência do 6-BA (Figura 6f). Da mesma forma, na figura 6g, o meio de cultura com 5,0  $\mu\text{M}$  de KIN e 15  $\mu\text{M}$  de 6-BA teve também um valor elevado para  $R^2$  (80,9%), apesar de serem estatisticamente semelhantes às concentrações de 0,0 e 10,0  $\mu\text{M}$  de KIN. Este resultado da figura 6g mostra um caso que levou à interação significativa das duas citocininas na análise de variância, pois houve diferença estatística quando nas concentrações de 15 e 20  $\mu\text{M}$  de KIN para a concentração fixa de 15  $\mu\text{M}$  de 6-BA. ILLG et al. (1983) constatou a interação entre os mesmos fitorreguladores e houve superioridade para a concentração fixa de 25 $\mu\text{M}$  de 6-BA e demais concentrações de KIN.



**Figura 6** - Valores de comprimento de planta (cm) observados e regressões estimadas (6a-6j) dentro de cada concentração (desdobramentos de graus de liberdade da análise de variância) para o dialélico com (0,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0  $\mu\text{M}$  de 6-BA) X (0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0  $\mu\text{M}$  de KIN).

Nas Figuras 6h e 6i, obtiveram-se valores máximos de comprimento fixando 20 e 25  $\mu\text{M}$  de 6-BA para a concentração zero de KIN (regressão). Neste experimento, verificou-se que concentrações acima de 5 $\mu\text{M}$  de 6-BA (experimento anterior) também se mostraram promissoras para crescimento de ápice caulinar desse clone, o que foi assegurado por valores de  $R^2$  maiores que 90,0% e com diferença estatisticamente significativa (Tukey 5%) para 25  $\mu\text{M}$  de KIN no comprimento de 5,39 cm. Portanto, pode-se concluir que podem ser utilizados meios de cultura com combinações das duas citocininas e também com o 6-BA isolado para crescimento de ápice caulinar.

#### 4.1.3 Efeito de diferentes níveis de sacarose na bulbificação *in vitro* de alho

Após a avaliação da altura das plantas obtidas no experimento anterior (4.1.2), estas foram transferidas aleatoriamente para cinco tratamentos com diferentes concentrações de sacarose para bulbificação. Após 90 dias nestes novos meios de cultura foram avaliadas: a razão bulbar, a massa fresca e seca (g) e a perda de água (PA%) dos bulbinhos obtidos após a cura (temperatura ambiente) de 40 dias. As médias para os cinco tratamentos para estas variáveis estão apresentadas na tabela 5.

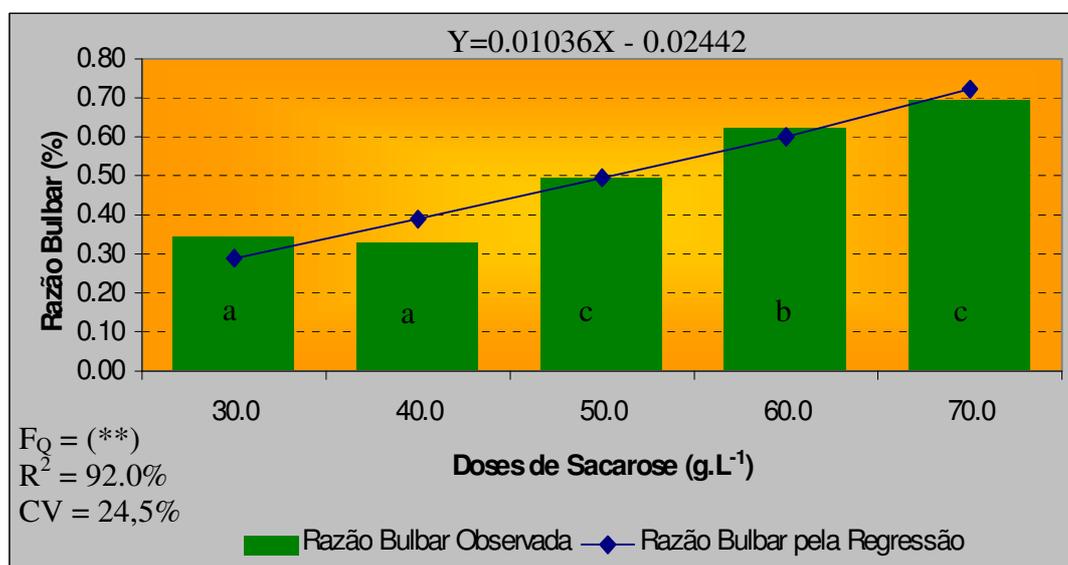
**Tabela 5** – Médias das características avaliadas (razão bulbar, massa fresca e seca (g) e perda de água (%) de bulbinhos) para cinco diferentes tratamentos variando a concentração de sacarose no meio de cultura visando à bulbificação *in vitro*.

Sac.	Nº <sup>(1)</sup>	Razão <sup>(4,9)</sup>	Tukey	Nº	Massa <sup>(5)</sup>	Tukey	Nº	Massa <sup>(6)</sup>	Tukey	Nº	PA% <sup>(3,7)</sup>	5%
	Rep. <sup>(2)</sup>	Bulbar	5%	Rep.	Fresca	5%	Rep.	Seca	5%	Rep.		
70	19	0.69	a <sup>(8)</sup>	18	1.70	a	12	0.60	a	12	0.39	a
60	30	0.62	a	29	1.45	ab	20	0.56	a	20	0.50	a
50	21	0.49	b	20	1.58	a	13	0.96	a	13	0.40	a
40	29	0.32	c	23	1.20	ab	19	0.67	a	19	0.42	a
30	18	0.34	c	15	0.93	b	4	0.92	a	4	0.27	a

Sac = Sacarose. <sup>(1)</sup> Nº = número; <sup>(2)</sup> Rep. = repetição; <sup>(3)</sup> PA% = Perda de água dos bulbinhos após a cura. <sup>(4)</sup> CV(%) = 24.5; <sup>(5)</sup> CV(%) = 42.4; <sup>(6)</sup> CV(%) = 16.4; <sup>(7)</sup> CV(%) = 8.8. <sup>(8)</sup> Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. <sup>(9)</sup> Razão bulbar: diâmetro do pseudocaulo dividido pelo diâmetro maior do bulbinho.

O histograma (Figura 7) mostra os valores da variável razão bulbar observada e a regressão linear de melhor ajuste dos dados para cinco concentrações de sacarose. Pode-se observar que a razão bulbar praticamente aumentou de acordo com o aumento

da sacarose. As concentrações de sacarose de 60 e 70 g.L<sup>-1</sup> não foram as melhores concentrações para o formato de bulbinho, pois apresentaram valores acima de 0,62 e 0,69 respectivamente. Quanto menor for a razão bulbar, melhor é a conformação de bulbos. A concentração de sacarose mais próxima do ideal (0,5) para variável razão bulbar foi a concentração de 50 g.L<sup>-1</sup> que obteve 0,49 e apresentou diferença estatística para todas as demais concentrações (Figura 8). Da mesma forma, a massa fresca de bulbinho na concentração de sacarose 50 g.L<sup>-1</sup> foi razoável (1,58 g), e não mostrou diferença estatística entre as concentrações de sacarose de 70,0 a 40,0 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 5). Pelo histograma (Figura 7), como a equação de melhor ajuste foi a linear, com um valor excelente para R<sup>2</sup> (92,0%), depreende-se que concentrações maiores de sacarose (> 70 g.L<sup>-1</sup>) poderão ser testadas para verificar o aumento de massa de bulbinhos (favorável para plantio posterior dos mesmos) e simultaneamente o formato do bulbinho pela razão bulbar. Trabalhos de RACCA et al. (1989); CID (1992); SIBOV & ILLG (1992) e TORRES et al. (2000) obtiveram resultados semelhantes aos nossos quando testaram elevadas concentrações de sacarose (≥ 60 g.L<sup>-1</sup>) proporcionando altos valores de produção de bulbinhos, acima de 70%.

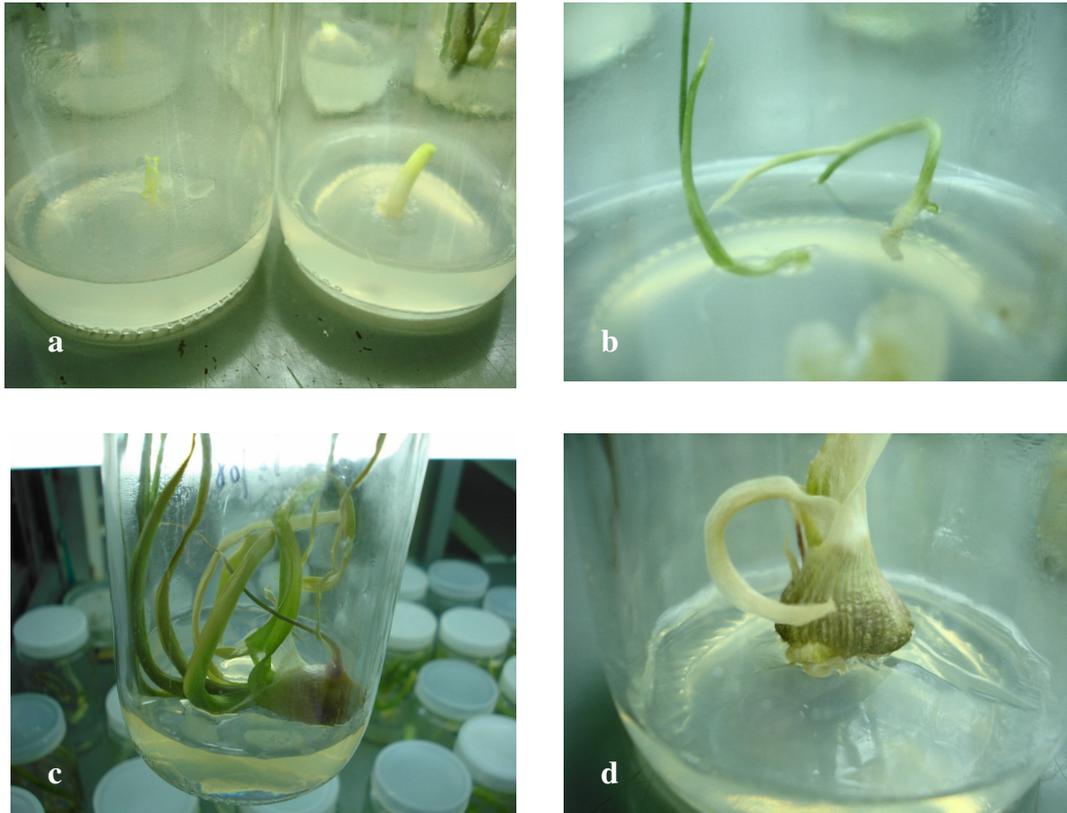


**Figura 7** - Valores de razão bulbar observada e pela regressão linear para as cinco concentrações de sacarose testadas. Razão bulbar: diâmetro do pseudocaule dividido pelo diâmetro maior do bulbinho.

Apesar da maior concentração testada (70 g.L<sup>-1</sup>) somente diferir estatisticamente da concentração mínima de sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>), dentro da precisão experimental obtida

(CV% = 42,4), a primeira apresentou o maior valor de massa fresca de bulbinho em relação a todas as demais concentrações testadas (Tabela 5). De certa forma, parece haver um decréscimo (g) na característica de massa fresca com a redução da concentração de sacarose no meio de cultura. Este fato também pode ser notado na característica razão bulbar.

Para a variável massa seca, novamente, o maior valor foi obtido com a concentração de 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Não houve diferenças estatísticas para massa seca de bulbinho e porcentagem de perda de água (Tabela 5), apesar da melhor precisão experimental obtida (CV% 16,4 e 8,8 respectivamente). A presença de semelhança estatística de massa seca e o oposto, com contrastes significativos, de massa fresca fazem-nos supor que a perda de água ou o acúmulo de água nos tecidos dos bulbinhos seguem padrões distintos de acordo com o meio de cultura ou concentração de sacarose. Apesar de não ser significativa, a maior média de perda de água foi para a concentração de 60 g.L<sup>-1</sup> com 50,0%. Por outro lado, a menor concentração de sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>) teve menor perda de água (27,0%). Vale ressaltar que nesta menor concentração foi observada a menor quantidade de bulbinhos viáveis (quatro) após a cura.



**Figura 8** - Cultura de ápices caulinares de alho, clone IAC 19: a) e b) Estádios iniciais em meio de crescimento MS completo acrescido com  $5,0 \mu\text{M}$  de KIN e  $0,0$  de 6-BA do tratamento T6; c) Planta em meio MS completo suplementado com  $60 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e sem fitorreguladores com formação de bulbinho de alto valor de razão bulbar  $\geq 0,5$  (bulbinho mal formado com a base do pseudocaule emitindo folhas novas); d) Bulbinho de melhor conformação com razão bulbar  $\leq 0,5$  em meio MS completo suplementado com  $50 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e sem fitorreguladores.

A quantidade de plantas que formaram bulbinhos e a quantidade de chochos após a cura de 40 dias em condições ambiente estão apresentados na tabela 6.

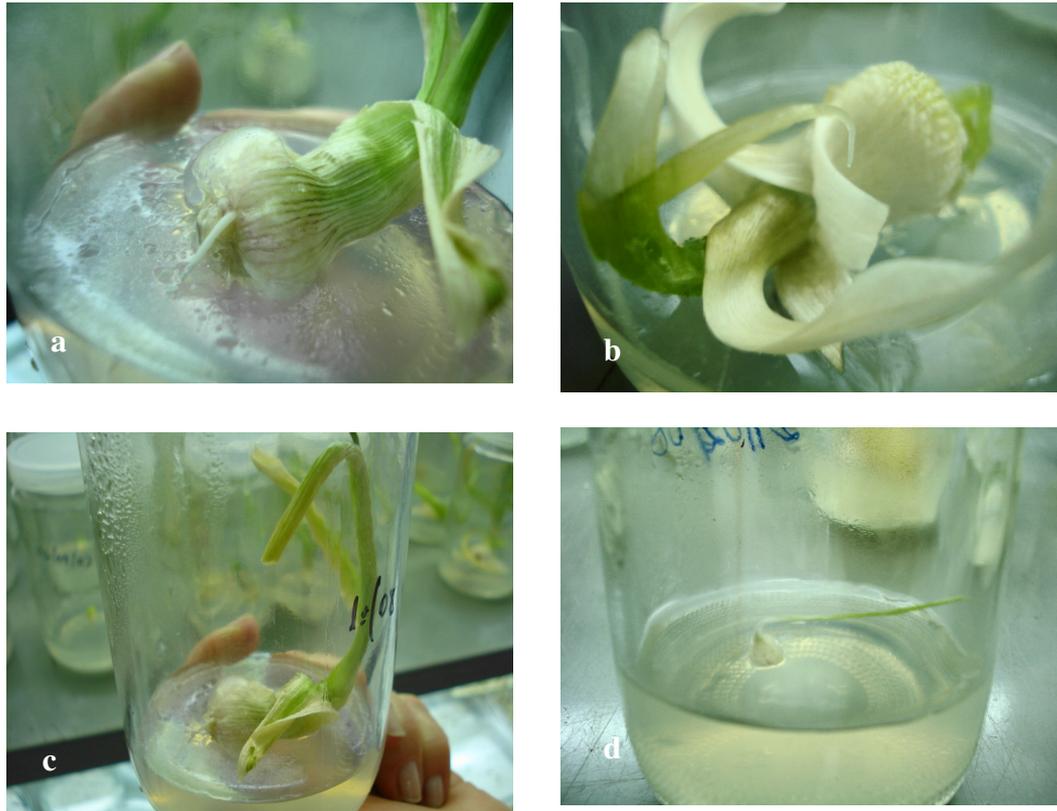
**Tabela 6** - Resultados da taxa de bulbificação de plantas e da taxa de chochamento de bulbinhos após a cura de 40 dias sob condição ambiente.

Meios de cultura Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	Nº de ápices Inoculados	Nº de Bulbinhos	Bulbificação (%)	Nº de bulbinhos Chochos	Chochos (%)
30,0	55	15	27,2	11	73,3
40,0	56	23	41,1	4	17,4
50,0	50	20	40,0	7	35,0
60,0	53	29	54,7	9	31,0
70,0	42	18	42,9	6	33,3

Salienta-se que o número de repetições ou de ápices inoculados nos meios de sacarose foi elevado, pois as plantas desenvolvidas no dialético 5x5, com 12 plantas por combinação, foram distribuídas equitativa e aleatoriamente nos novos meios de cultura.

Observa-se que a menor concentração de sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>) apresentou a menor taxa de bulbificação (27,2%) e, dos bulbinhos formados, 73,3% chocharam. Excetuando-se a concentração de sacarose no meio de 40 g.L<sup>-1</sup> (17,4%) as demais ficaram ao redor de 30% de bulbinhos chochos. Pode-se concluir que a melhor concentração de sacarose no meio de cultura após o crescimento do ápice caulinar deve ser de 50,0 g.L<sup>-1</sup> por reunir os valores de máxima massa seca de bulbo, razão bulbar ideal, razoável valor de massa fresca de bulbo e níveis razoavelmente baixos de chochamento após a cura. Pois, a menor concentração de sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>), que obteve baixa razão bulbar (Figura 10), também obteve baixo valor de massa fresca e bulbificação, além de alta taxa de chochamento.

Por experiências e observações anteriores no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro, verificou-se que a bulbificação ocorria *in vitro*, mas muitas vezes não havia interrupção do desenvolvimento vegetativo das plantas, como ocorre em condições naturais, onde a planta entra em senescência com seca contínua das folhas até a maturação e dormência dos bulbos por ocasião da colheita. Portanto, nas condições *in vitro*, as folhas continuam sendo emitidas e, por essa razão, os bulbinhos não entram em dormência e perdem água após a retirada do meio de cultura, havendo chochamento, provavelmente pela umidade no interior do frasco (Figura 9).



**Figura 9** - Cultura de ápices caulinares de alho, clone IAC 19: a), b), c) Diferentes bulbinhos formados inicialmente em meios do dialélico 6-BA x KIN, seguido de transferência das plantas para meio com elevada concentração de sacarose para bulbificação. Os bulbinhos estão formados, mas a parte aérea não mostra senescência. d) Bulbinho de razão bulbar ideal, mas com emissão contínua de brotações contribuindo para o chochamento quando da retirada das condições *in vitro* e manutenção no ambiente.

No sistema *in vitro*, foi observado que após o início da bulbificação, pelo aumento do potencial osmótico do meio com aumento da concentração de sacarose e a manutenção das plantas sempre em regime de 16 horas de luz por 8 horas de escuro (“dias longos”), há contínuo secamento e emissão de folhas, mesmo já tendo formado os bulbinhos (Figuras 9 e 10). Por essa razão, decidiu-se modificar as concentrações de nutrientes do meio básico e, principalmente as quantidades de sais nitrogenados (amoniacoal e nítrico) presentes no MS, além de testar duas concentrações de sacarose (MAGALHÃES, 1986) no experimento a seguir (4.1.4). Vale salientar que nas condições de campo, a adubação nitrogenada, principalmente na forma reduzida amoniacoal, como uréia, sulfato de amônio ou mono-amônio fostato (MAP) pode causar o distúrbio genético/fisiológico do alho conhecido como pseudoperfilhamento ou

superbrotamento (COSTA et al., 1993; MELO & OLIVEIRA, 1999). Este distúrbio muito comum nos alhos nobres e nos precoces também é influenciado por muita umidade (chuvas e irrigação demasiadas) na fase de desenvolvimento dos bulbos (VASCONCELLOS et al., 1971; SOUZA & CASALI, 1986; RESENDE & SOUZA, 2001). Como no sistema *in vitro* são fornecidos continuamente sais minerais (inclusive nitrogênio) às plantas, além da manutenção de elevada umidade relativa nos frascos de cultura, decidiu-se estudar o controle da emissão de novas folhas (brotações) durante a fase de transferência para meio de cultura visando a bulbificação. Outro problema que pode advir da cultura de ápices caulinares *in vitro* é o aumento do número de bulbinhos chochos por influência do fornecimento constante do nitrogênio do meio MS. Sob condições de cultivo a campo existe correlação de frequência de bulbos chochos com doses crescentes de N (COSTA et al., 1993; MAROUELLI et al., 2001).



**Figura 10** - Formação de bulbo com toailete prévia das folhas externas mostrando a brotação nova do bulbo evidenciando a ausência de dormência das gemas vegetativas presentes na base do bulbo.

#### **4.1.4 Efeito de diferentes níveis de sacarose e nitrogênio total na bulbificação *in vitro***

De acordo com o observado no experimento anterior (4.1.3), foram feitos meios de cultura alterando as concentrações do meio MS, nitrogênio do MS e sacarose, nas combinações apresentadas anteriormente em material e métodos (3.1.7).

A tabela 7 mostra as médias das características avaliadas (massa seca de folha (g), escala de notas de folhas (1 a 4) e massa seca (g) de bulbinho) e a significância dos contrastes observados para os 10 tratamentos de bulbificação com diferentes

concentrações de sacarose, nitrogênio e MS, depois do crescimento preliminar dos ápices em meio MS completo, acrescido de 5 µM de 6-BA por cerca de 40 dias. Para melhor visualização das dispersões dos dados foram feitos histogramas a partir da tabela 7, gerando as figuras 12 a 14.

**Tabela 7** – Médias das características avaliadas para massa de bulbinho (g), escala de notas (1 a 4) para intensidade de necrose e coloração da parte aérea (folhas) e massa seca de folha de bulbinho (g) em meios de cultura com variação da concentração do meio MS, de sacarose e de nitrogênio.

Meios	Nº Rep.	Massa Seca		Escala de		Massa Seca	
		de Folha (g) <sup>(1)</sup>	5%	Notas de Folhas <sup>(2,5)</sup>	5%	Bulbinho (g) <sup>(3)</sup>	5%
1 = MS + 60 Sac.	18	0.17	bc	2.20	bcd	0.73	a <sup>(4)</sup>
2 = ½ MS + 60 Sac.	19	0.21	bc	2.07	bcd	0.57	ab
3 = MS + 60 Sac. s/N	18	0.11	bc	1.43	d	0.40	abc
4 = ½ MS + 60 Sac. s/N	19	0.09	c	1.53	cd	0.48	abc
5 = MS + 30 Sac.	17	0.40	a	3.63	a	0.24	bcd
6 = ½ MS + 30 Sac.	17	0.26	ab	2.34	bcd	0.30	bcd
7 = MS + 30 Sac. s/N	19	0.11	bc	2.54	ab	0.23	cd
8 = ½ MS + 30 sac. s/N	19	0.12	bc	2.14	bcd	0.27	bcd
9 = 60 + Agar-água	18	0.11	bc	1.32	d	0.19	cd
10 = 30 + Agar- água	18	0.20	bc	2.48	abc	0.08	d

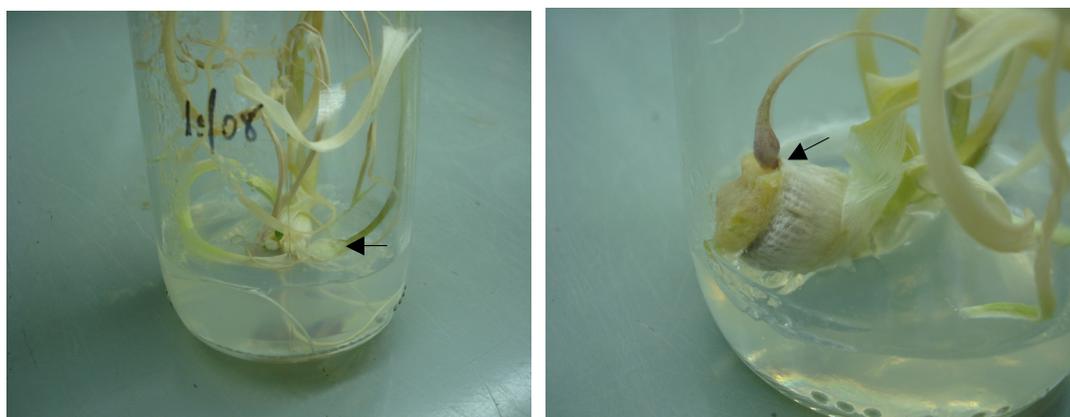
Sac. = sacarose; s/N = sem nitrogênio; Nº = número; Rep = repetição; MS = Murashige & Skoog (1962).  
<sup>(1)</sup>CV(%) = 6,6; <sup>(2)</sup>CV(%) = 22,2; <sup>(3)</sup>CV(%) = 11,3. <sup>(4)</sup>Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. <sup>(5)</sup>Notas de folhas: folhas completamente secas (nota 1), somente a base da planta ainda verde (nota 2), planta somente com a ponta das folhas secas (nota 3) e completamente verdes (nota 4).

No tratamento 5 (MS completo acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose) a massa seca de folha retirada dos bulbinhos no final do experimento (cerca de 60 dias em meio de bulbificação) foi maior significativamente que os demais meios, exceto no tratamento 6

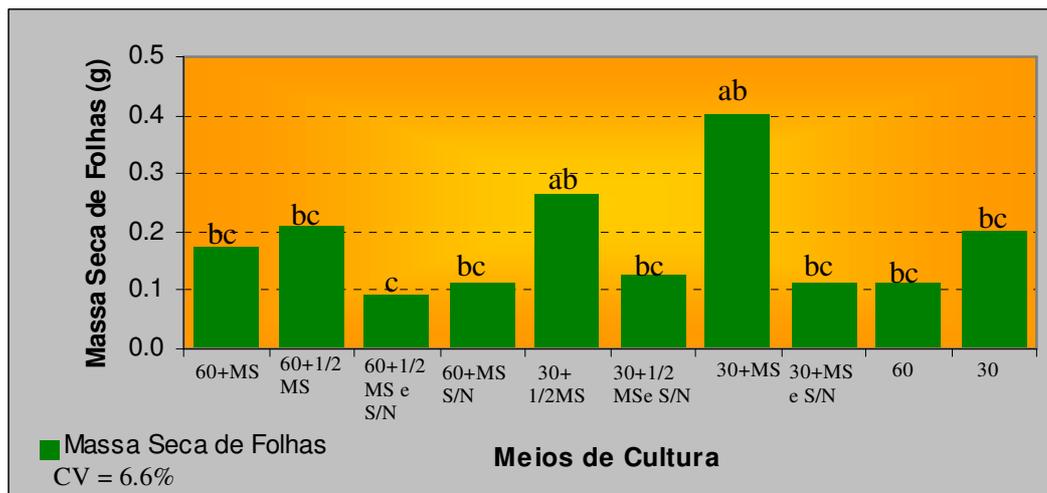
( $\frac{1}{2}$ MS + 30 g.L<sup>-1</sup>), onde foi semelhante. Nos demais tratamentos, não houve variação significativa na massa seca de folha. Esta variável foi, portanto, de baixa discriminação para escolha de meios de cultura, a julgar pelas múltiplas variações estabelecidas. Por outro lado, a variável nota de necrose e coloração durante a fase final de bulbificação, foi a que melhor diferenciou os meios de cultura. Analisando a tabela 7 e o histograma da figura 12, observa-se que o meio de cultura mais simples com água-ágar (T9) acrescido de 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose foi o que teve as folhas com maior nível de seca (senescência), ficando mais próximo de um (Tabela 7). Utilizando-se água-ágar e reduzindo-se a sacarose pela metade (30 g.L<sup>-1</sup>) no tratamento 10, o valor encontrado para a mesma característica passou para nota média de 2,5 diferindo estatisticamente da concentração de 60 g.L<sup>-1</sup>. Por outro lado, o meio simples sem nutrientes e com 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, apesar de causar a senescência das folhas (sem brotações novas) após a formação dos bulbinhos, teve o menor valor para massa seca após 14 dias de colheita ou cura (0,08 a 0,19g). O ideal é que o meio forneça condições iniciais de manutenção e crescimento de folhas para produção de bulbinhos de maiores massas, porém com interrupção de novas emissões de folhas. Neste contexto, observou-se que os meios de cultura mais próximos deste ideal foram aqueles que continham metade dos sais MS + 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (T4) e MS completo com 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (T3), porém ambos sem nitrogênio. É sabido que reduzindo a disponibilidade do nitrogênio na fase de indução e crescimento de bulbinho, pode-se reduzir a produção de novas folhas, melhorando posteriormente sua conservação durante o processo de cura (BARKER & MILLS, 1980). As combinações de sais de MS e nitrogênio (tratamentos 5 a 8) não mostraram efeito na concentração de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose para aumento de massa de bulbinho e redução de notas de folha. Concluiu-se, portanto que, para aumento de massa de bulbinho simultaneamente com a senescência de folhas durante o processo de bulbificação *in vitro*, deve-se aumentar a concentração de sacarose, fornecer nutrientes pelo MS, mas retirar os compostos nitrogenados. Ressalte-se que a fase de crescimento de ápice é anterior a este processo de bulbificação e necessita de condições favoráveis de nutrição, portanto de MS completo com sacarose a 30 g.L<sup>-1</sup>. RODRIGUES (1994), utilizando cebola, também avaliou diferentes concentrações do nitrogênio total no meio MS para estudar o efeito do nitrogênio na bulbificação *in vitro*, porém não encontrou diferenças significantes estatisticamente, para as variáveis analisadas. Por outro lado, YURI et al. (2004), trabalhando com a cultivar nobre Caçador induziu primeiro o superbrotamento *in vitro* com a frigorificação ou vernalização prévia dos bulbos

(doadores de ápices) e depois transferência para meio de crescimento de ápices. Com isso obteve uma taxa de multiplicação média em torno de 1:2, inferior ao obtido por MORICONI et al. (1990) e por ILLG (1995). Salienta-se que para cultivares nobres, ou seja, aqueles muito exigentes em fotoperíodo (> 13hs de luz) para bulbificar e que são genotipicamente muito sensíveis ao superbrotamento, como o caso da cv Caçador do trabalho de YURI et al. (2004), a estratégia adotada poderia ser outra: ao invés do uso de vernalização nos bulbos antes da retirada dos ápices, o aumento da concentração de sacarose no período de cultivo em meio de cultura, a exemplo do que foi realizado no presente trabalho. O nosso resultado mostra que as plantas continuam a emitir novas folhas externas e internas ao bulbinho *in vitro*, semelhante ao fenômeno de superbrotamento, com o fornecimento contínuo de N no meio MS. Isto provocou brotações laterais e formação de novos bulbinhos. Este fato ocorreu de forma esporádica na cultivar IAC-19, pois esta é considerada muito resistente ao super brotamento (LISBÃO et al., 1993), como pode ser visto na figura 11.

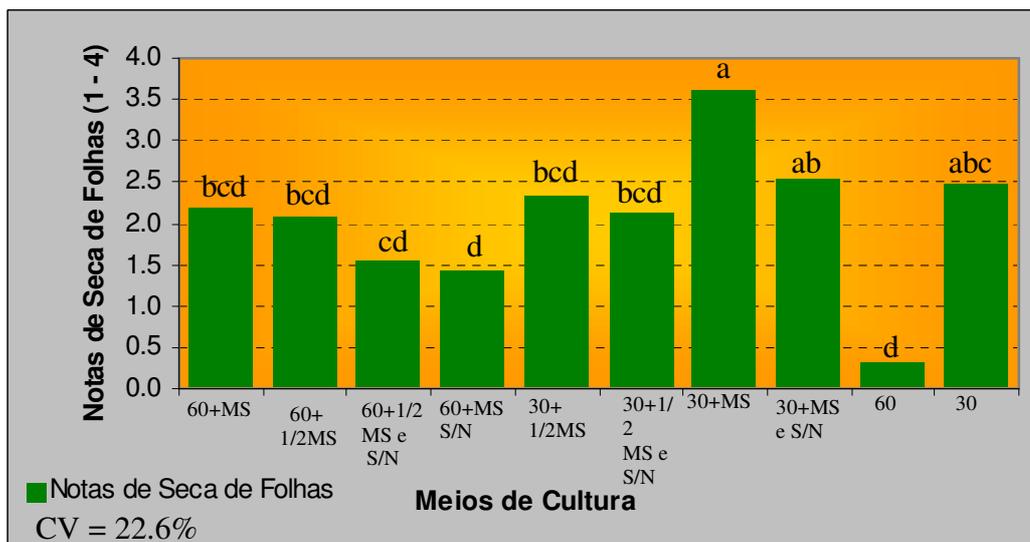
As figuras 12, 13 e 14 mostram, em histograma, os valores observados de massa seca (g) de folhas, notas (1 a 4) para intensidade de necrose e coloração de folhas e massa seca (g) de bulbinhos, para os dez tratamentos testados com diferentes concentrações de MS, sacarose e nitrogênio para desenvolvimento de bulbinhos.



**Figura 11** - Bulbinhos de alho da cultivar IAC-19, formados em meio de bulbificação MS completo, sem fitorreguladores, suplementado com 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (T1). Nota-se bulbificação (setas) a partir de gemas laterais.

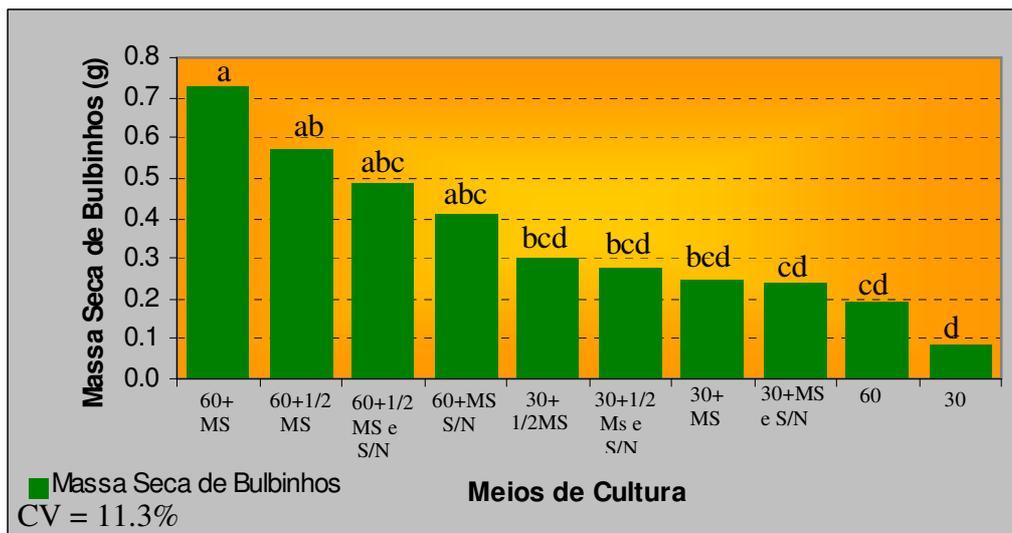


**Figura 12** – Valores de massa seca (g) de folhas observados para os dez tratamentos testados com diferentes concentrações de MS, sacarose e nitrogênio para desenvolvimento de bulbos.



Notas de folhas: folhas completamente secas (nota 1), somente a base da planta ainda verde (nota 2), planta somente com a ponta das folhas secas (nota 3) e completamente verdes (nota 4).

**Figura 13** – Valores de notas (1 a 4) de intensidade de necrose e coloração da parte aérea (folhas) observados para os dez tratamentos testados com diferentes concentrações de MS, sacarose e nitrogênio para desenvolvimento de bulbos.



**Figura 14** – Valores de massa seca (g) de bulbinhos observados para os dez tratamentos testados com diferentes concentrações de MS, sacarose e nitrogênio para desenvolvimento de bulbos.

Na tabela 8, estão as taxas de bulbificação e de bulbinhos chochos nos dez meios de cultura. Novamente verifica-se que os meios de cultura com 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose apresentaram-se mais favoráveis ao processo de bulbificação e controle do chochamento. Todas as combinações de MS com 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose com e sem nitrogênio tiveram 0,0% de bulbinhos chochos. Da mesma forma em que foram discutidos para as variáveis notas de necrose e coloração de folhas e massa seca de bulbinhos, nota-se que os melhores meios de cultura para aumento da bulbificação e redução de chochamento foram ½ MS + 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (tratamento 3) e MS completo + 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (tratamento 4), ambos sem nitrogênio.

**Tabela 8** – Porcentagem de plantas que bulbificaram (%) e chochamento dos bulbinhos obtidos (%) após a cura de 35 dias em condições ambiente.

Tratamento/Meio de cultura	% Bulbificação	% Chochamento
1=60g.L <sup>-1</sup> de Sacarose + MS	88,9	0,0
2=60g.L <sup>-1</sup> de Sacarose + ½MS	75,0	0,0
3=60g.L <sup>-1</sup> 60g/L de Sacarose + MS (Sem Nitrogênio)	100,0	0,0
4=60g.L <sup>-1</sup> 60g/L de Sacarose + ½MS (Sem Nitrogênio)	89,5	0,0
5=30g.L <sup>-1</sup> de Sacarose + MS	63,2	25,0
6=30g.L <sup>-1</sup> de Sacarose + ½MS	88,2	0,0
7=30g.L <sup>-1</sup> de Sacarose + MS (Sem Nitrogênio)	94,7	11,1
8=30g.L <sup>-1</sup> de Sacarose + ½MS (Sem Nitrogênio)	89,5	0,0
9=60g.L <sup>-1</sup> + Água-agar	77,8	21,4
10=30g.L <sup>-1</sup> + Água-agar	55,6	20,0

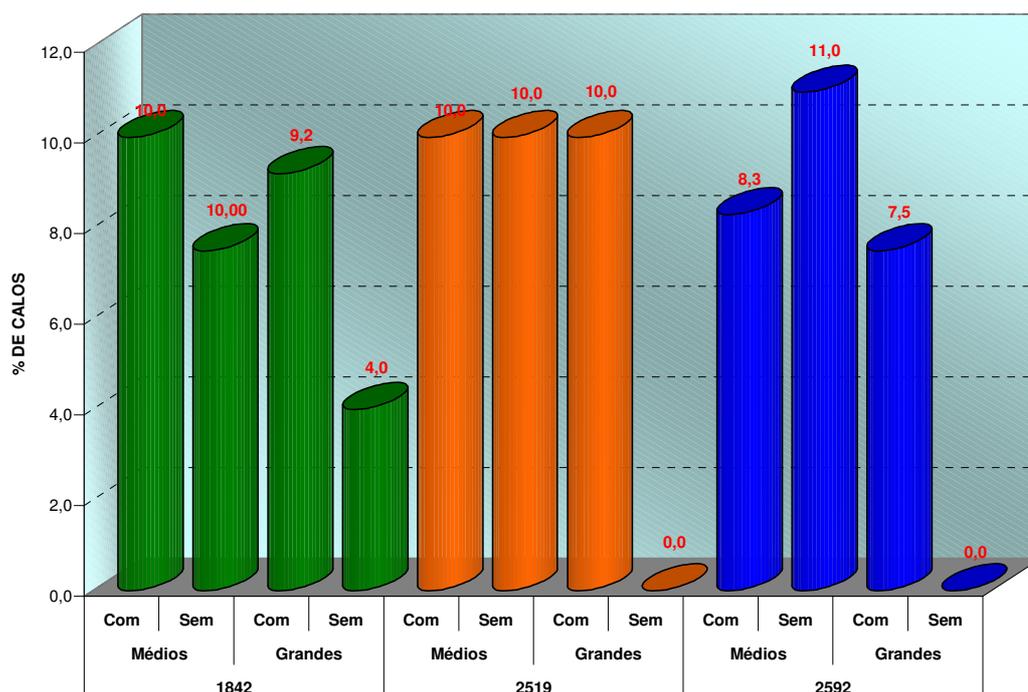
## 4.2 Ginogênese *In Vitro* de Cebola

### 4.2.1 Cultura de botões florais

#### 4.2.1.1 Influência do genótipo, estágio de desenvolvimento dos botões e meios de indução MI1 e MI2 na regeneração *in vitro*

Em agosto de 2006 foi feita coleta de inflorescências de cebola na empresa SAKATA. Foram coletadas umbelas abertas (sem antese de flores) e fechadas de três genótipos diferentes (1842, 2519, 2592). Dos três genótipos, inoculou-se um total de 700 botões florais, sendo inoculados 320 botões para o genótipo 1842, 140 botões para o genótipo 2519 e 240 botões para o genótipo 2592.

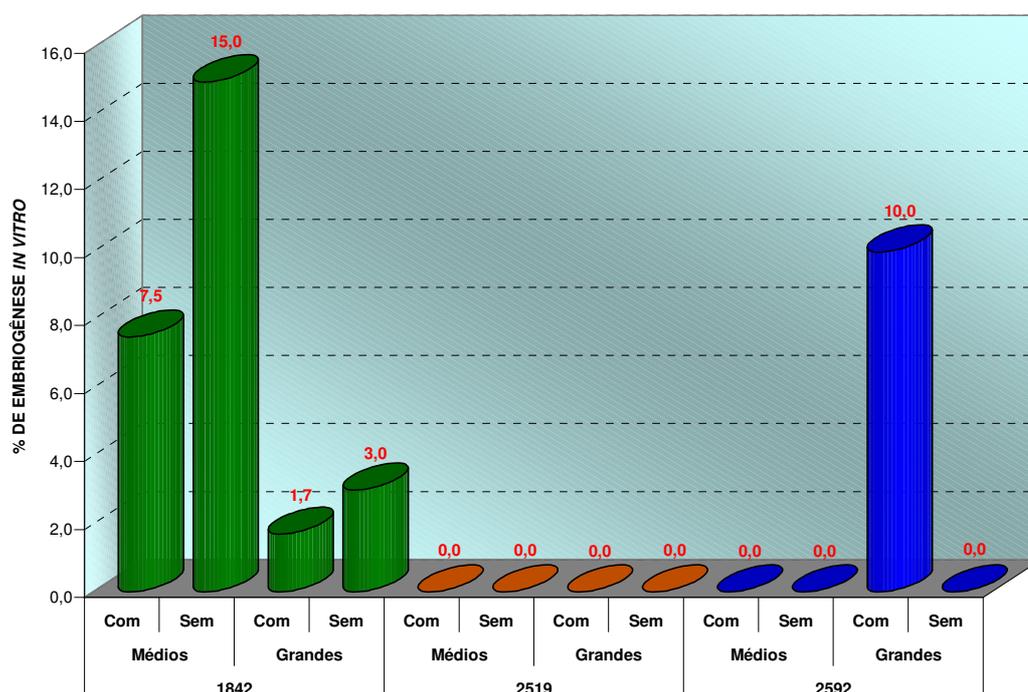
Os resultados de taxa de calogênese obtidos nos diferentes tratamentos (variação de meios de cultura, de estádios de botões florais e de genótipos), após um período de 45 dias de repicagem são mostrados na figura 15. A análise estatística apresentou somente efeito significativo de estágio de botões florais pelo teste F na análise de variância. O coeficiente de variação experimental foi razoável, com valor de 28,5%.



**Figura 15** - Taxa de calogênese em porcentagem obtida em três diferentes genótipos de cebola (1842; 2519; 2592) à partir de cultivo de botões florais de diferentes tamanhos: médios (0,014 g e/ou  $\geq 4$  mm) e grandes (0,018 g e/ou  $\geq 5$  mm) e em meios de indução: MI1 - B-5 suplementado com de  $75 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose, com fitorreguladores e MI2 - B-5 suplementado com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose, sem fitorreguladores.

O genótipo 1842 foi o mais responsivo, com porcentagem de calos superior a 4,0 para as variáveis testadas (tamanho de botão; meios MI1 e MI2), tendo melhor desempenho com tamanho de botão médio (0,014 g e/ou  $\geq 4$  mm). Os genótipos 2519 e 2592 também tiveram melhor desempenho com tamanho médio (0,014 g e/ou  $\geq 4$  mm) de botões. Já a presença e ausência de fitorreguladores e maior ou menor concentração de sacarose (meios MI1 e MI2), foi variável (0,0 a 11,0%) entre os três genótipos .

A quantidade de calos que apresentaram formações embriogênicas pelo número total de botões inoculados (viáveis) por tratamento, encontra-se na figura 16.

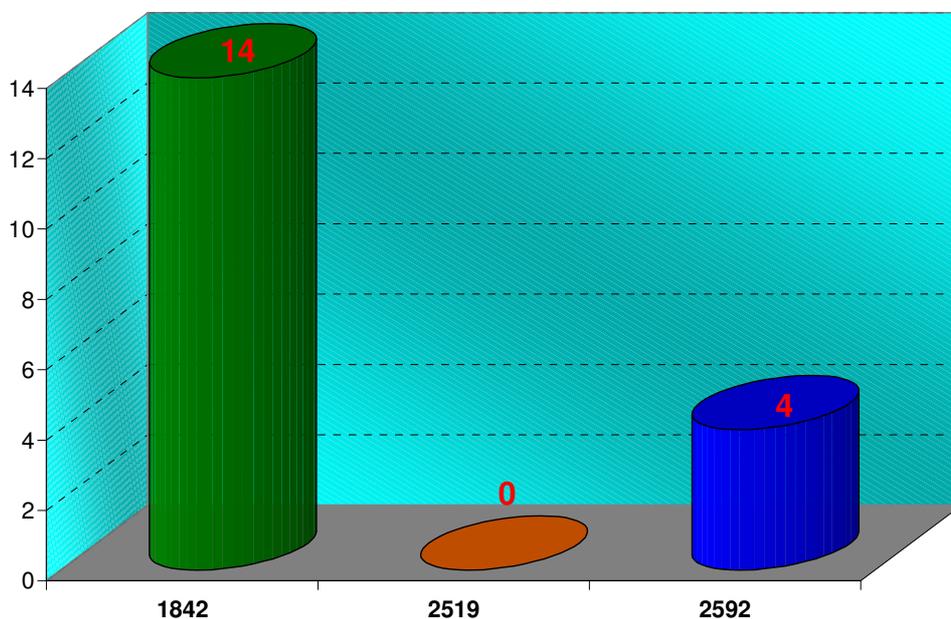


**Figura 16** - Porcentagem de embriões formados em três diferentes genótipos de cebola (1842; 2519; 2592) à partir de cultivo de botões florais de diferentes tamanhos: médios (0,014 g e/ou  $\geq 4$  mm) e grandes (0,018 g e/ou  $\geq 5$  mm) e em meios de indução: MI1 - B-5 suplementado com de 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, com fitorreguladores e MI2 - B-5 suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, sem fitorreguladores.

Para essa característica (Figura 16), observou-se um efeito acentuado de genótipos entre os tratamentos utilizados de: presença (MI1) e ausência (MI2) de fitorregulador no meio de cultura básico e tamanho de botões florais. Novamente o genótipo 1842 foi o mais responsivo a todos os tratamentos aplicados. Para esse genótipo, a presença constante de fitorregulador desde o início da inoculação dos botões florais até após a primeira repicagem (45 dias) foi prejudicial para o estabelecimento do

processo de embriogênese (regeneração de plantas). Houve uma redução significativa na taxa de calos que apresentaram plantas regeneradas, ou seja, de 18,0% para 9,2% na taxa de regeneração, agrupando-se os estádios de botões florais (grandes, médios e pequenos) nas classes sem (MI1) e com (MI2) fitorregulador. De forma oposta, dentro ainda do contexto de efeito de genótipos, houve resposta positiva para o genótipo 2592 somente no tratamento em que foram utilizados botões grandes (0,018 g e/ou  $\geq 5$  mm) e na presença (MI1) de fitorreguladores, com 10,0% de taxa de calos apresentando regeneração. Pode-se observar que a resposta favorável ao meio de cultura é muito influenciada pelo genótipo e, dentro deste, pelos estádios dos tecidos do explante inoculado.

O tratamento com meio de cultura sem (MI2) fitorregulador foi mais eficiente para regeneração. O único tratamento responsivo para regeneração de plantas no genótipo 2592 foi para botões grandes (0,018 g e/ou  $\geq 5$  mm) e, nesse caso, com a presença (MI1) contínua de fitorregulador. Nenhuma planta foi obtida no genótipo 2519. A figura 17 apresenta em valores totais (absolutos), o número de plantas conseguidas com os três genótipos testados.



**Figura 17** – Número absoluto de plantas regeneradas, juntando-se tamanho de botões médios (0,014 g e/ou  $\geq 4$  mm) e grandes (0,018 g e/ou  $\geq 5$  mm) e meios de indução (MI1 e MI2), para cada um dos três genótipos testados (1842; 2519 e 2592).

As dezoito plantas obtidas foram isoladas dos calos e transferidas para meio de cultura MS com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose para crescimento, enraizamento e aclimação, mas infelizmente nesse período, 61,11% das plantas foram perdidas por contaminação, 27,77% por hiper-hidricidade e 11,11% não agüentaram a tentativa de aclimação e não sobreviveram em casa de vegetação.

De qualquer forma, esses resultados preliminares obtidos mostraram a necessidade de se dar continuidade às pesquisas, pois indicam uma alta influência do genótipo em relação ao tamanho do explante (botão floral) e do uso contínuo ou não de fitorreguladores nos meios testados (MI1 e MI2).

#### 4.2.1.2 Efeito de genótipo, tamanho dos botões florais, meios de indução e tempo de exposição no meio de indução na regeneração *in vitro*

Foram recebidas umbelas (abertas e fechadas) de cebola num período de aproximadamente três meses (11/07/07 a 17/10/07) de 15 genótipos. Destes, foram inoculados 9360 botões florais aproximadamente 32.982 óvulos (6 óvulos por botão floral) dos quais 5497 botões florais foram viáveis (41,27% contaminação). Na tabela 9, pode-se observar a quantidade de botões inoculados que não contaminaram, seus estádios de umbela e botão, e o tempo no meio de indução.

**Tabela 9** – Número absoluto de botões florais que não contaminaram (viáveis) obtidos para cada estádio de explante e tempo nos meios de indução de ginogênese de cebola: MI1 – B-5 com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, suplementado com 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e MI3, mesmo meio de indução MI1, porém suplementado com 500 mg.L<sup>-1</sup> de espermina.

Explantes/Estádios	Tempo no meio de indução para ginogênese					Contínuo	Total
	7 dias	14 dias	21 dias	45 dias			
Umbela aberta/botão grande	220	205	240	160		60	885
Umbela aberta/botão médio	236	202	267	140		100	945
Umbela aberta/botão pequeno	240	219	231	1420		100	930
Umbela fechada/botão grande	168	188	160	120		120	756
Umbela fechada/botão médio	173	228	183	220		140	944
Umbela fechada/botão pequeno	193	200	164	320		160	1037
Total	1230	1242	1245	1080		640	5497

ALAN et al. (2004) e MICHALIK et al. (2000) observaram que o tamanho de botão tem efeito na indução de ginogênese e que os botões médios e grandes têm maior taxa de regenerações. Com base nisso, procurou-se realizar uma triagem de estádios de maturação de umbelas e botões (Tabela 10) aliada a tempos diferentes no meio indutivo, relacionando estes caracteres à regeneração dos explantes inoculados.

**Tabela 10** - Porcentagem de regeneração de plantas de cebola para cada tipo de explante (botão floral) e o estágio de desenvolvimento da umbela (planta matriz) de que o explante foi retirado.

Explantes/Estádios	%
Umbela aberta botão grande	0,145
Umbela aberta botão médio	0,145
Umbela aberta botão pequeno	0,109
Umbela fechada botão grande	0,145
Umbela fechada botão médio	0,145
Umbela fechada botão pequeno	0,163

Nossos resultados mostraram que botões pequenos, provindos de umbela fechada, apresentaram maior porcentagem de regeneração. Segundo MUSIAL et al. (2005), os óvulos dos botões continuam a se desenvolver após a inoculação no meio de indução. Com isso, quanto maior o tempo de permanência no meio de indução, maior a probabilidade de formar embriões. Como, segundo os mesmos autores, os botões florais pequenos são os que estão num estágio mais prematuro no momento da inoculação (célula mãe - megásporo), eles tiveram maior chance de desenvolver o saco embrionário e regenerar.

Em relação ao tempo de permanência no meio de indução, observou-se um aumento no número de plantas regeneradas à medida que o tempo de permanência aumentou, com o valor máximo para os explantes que ficaram continuamente no meio indutivo MII (contínuo) (Tabela 11). Esta tentativa de avaliar a cinética de desenvolvimento por tempo de indução foi motivada pelos trabalhos de GEOFFRIAU et al. (2006), CAMPION et al. (1992), JAKŠE et al. (1996) e MARTINEZ et al. (2000). Isto foi feito com o intuito de reduzir a taxa de hiper-hidricidade dos explantes, uma vez que o tempo de permanência dos botões florais em meios com a citocinina 6-BA e a

presença de alto teor de sacarose ( $75 \text{ g.L}^{-1}$ ) são indutores deste processo fisiológico (SAHER et al., 2005, GEOFFRIAU et al., 2006). E não com intuito de diminuir oxidação, já que os botões inoculados nos meios de indução não oxidaram. Porém, ao contrário do que esperávamos, a permanência dos explantes nos diferentes períodos em meio de indução não reduziu a taxa de hiper-hidricidade dos mesmos. Esta variou de 0,0 a 100,0% e se manifestou de forma oscilante de acordo com o genótipo e estágio de desenvolvimento do explante e não com os dias de permanência em meio de indução (MI1 e MI3).

**Tabela 11** - Porcentagem de regeneração de plantas a partir de botões florais de cebola nos diferentes períodos de tempo em que permaneceram nos meios de indução MI1: B-5 com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D e  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6-BA, contendo  $75 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e  $5,8 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar e MI3, mesmo meio de indução MI1, porém suplementado com  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  de espermina. Considerando-se todos os 15 genótipos testados e todos os estádios de botões (grandes, médios e pequenos).

Dias	%
7	0,145
14	0,181
21	0,272
45 (Controle)	0,072
Contínuo	0,181
Espermina	0,036

Na tabela 12 verificamos comportamentos distintos entre genótipos, indicando dependência para regeneração.

**Tabela 12** - Porcentagem de plantas de cebola regeneradas a partir de botões florais que foram inoculados em meio de indução MI1: B-5 com  $2,0\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-D e  $2,0\text{mg.L}^{-1}$  de 6-BA, contendo  $75\text{g.L}^{-1}$  de sacarose e  $5,8\text{g.L}^{-1}$  de ágar e MI3, mesmo meio de indução MI1, porém suplementado com  $500\text{mg.L}^{-1}$  de espermina, considerando-se todos os diferentes períodos de tempo (7, 14, 21, 45 e controle contínuo) em que permaneceram em meio de indução para cada genótipo em particular.

Genótipos	%
2753	0,436
2510	0,163
2592	0,090
2770	0,072
2500	0,036
2125	0,018
2479	0,018
2752	0,018

Neste experimento testando-se botões florais, dentre os 15 genótipos utilizados, 8 genótipos (53,33%) regeneraram 47 plantas (0,855%). A literatura apresenta resultados semelhantes com baixa frequência de regeneração de plantas via ginogênese *in vitro*. BOHANEK et al. (1995) testaram ovários e óvulos obtendo 1,1 a 7,6% de plantas regeneradas para ovários e 0,1 a 0,6% para óvulos; GEOFFRIAU et al. (1997) estudaram 22 genótipos e obtiveram de 0 a 11,1% de plantas regeneradas; MICHALIK et al. (2000), estudaram 30 genótipos, dos quais 21 regeneraram de 0,2 a 10%. A literatura cita dependência do genótipo como fator predominante na resposta *in vitro* (CAMPION et al., 1992; JAKŠE et al., 1996; GEOFFRIAU et al., 1997; MICHALIK et al., 2000 e GEOFFRIAU et al., 2006). Tanto os resultados do experimento anterior (4.2.1.1) como resultados deste experimento (4.2.1.2) mostraram alta interação entre genótipos, meios de cultura e estádios de botões.

Na tabela 13 pode-se observar um resumo de todas as plantas regeneradas *in vitro* e sua sobrevivência.

**Tabela 13** – Resumo das plantas regeneradas *in vitro* a partir de botões florais inoculados e mantidos nos meios de indução (MI1 e MI3) por diferentes períodos de tempo (tempo de exposição - dias) no ano de 2007.

Genótipo	Umbela	Tamanho de Botão	Dias no meio de indução	Sobrevivência
2500	aberta	médio	21	Contaminação
2500	aberta	médio	21	Contaminação
2753	fechada	grande	contínuo	Contaminação
2753	fechada	grande	contínuo	Contaminação
2753	fechada	médio	7	Contaminação
2753	fechada	grande	contínuo	Contaminação
2753	fechada	médio	Espermina/contínuo	Contaminação
2753	fechada	grande	contínuo	Necrose
2753	fechada	pequeno	21	Não sobreviveu à aclimação
2753	fechada	médio	14	Não sobreviveu à aclimação
2753	fechada	médio	14	Não sobreviveu à aclimação
2753	fechada	médio	14	contaminação
2753	fechada	pequeno	21	Necrose
2753	fechada	grande	controle	Necrose
2753	aberta	médio	21	Contaminação
2753	aberta	pequeno	21	Contaminação
2753	aberta	médio	21	Contaminação
2753	aberta	grande	21	Contaminação
2753	aberta	pequeno	21	Contaminação
2753	aberta	pequeno	14	Contaminação
2753	aberta	pequeno	14	Contaminação
2753	aberta	pequeno	14	Contaminação
2753	aberta	pequeno	14	Contaminação
2753	aberta	pequeno	14	Contaminação
2753	aberta	médio	7	Contaminação
2753	aberta	médio	7	Contaminação
2479	aberta	médio	7	Contaminação
2510	fechada	pequeno	controle	Aclimatada
2510	fechada	pequeno	controle	Contaminação
2510	aberta	grande	contínuo	Contaminação
2510	fechada	pequeno	21	Necrose
2510	fechada	pequeno	21	Contaminação
2510	fechada	grande	21	Não sobreviveu à aclimação
2510	fechada	pequeno	contínuo	Contaminação
2510	fechada	grande	contínuo	Contaminação
2510	aberta	grande	7	Contaminação
2752	aberta	grande	controle	Necrose
2770	fechada	pequeno	14	Contaminação
2770	fechada	médio	21	Contaminação
2770	fechada	pequeno	21	Necrose.
2770	fechada	médio	14	Necrose
2592	aberta	médio	contínuo	Contaminação
2592	aberta	grande	21/espermina	Contaminação
2592	aberta	grande	contínuo	Contaminação
2592	fechada	grande	7	Contaminação
2592	fechada	médio	7	Contaminação
2125	aberta	grande	7	Contaminação

Como se pode notar na tabela 13 a taxa de sobrevivência das plantas foi baixa. Um dos fatores que podem ter contribuído para a baixa taxa de sobrevivência das plantas regeneradas foi a alta taxa de contaminação, agravada principalmente pelo manuseio para poda das raízes para análise cromossômica.

Outro fator de influência foi a aclimação, pois as plantas regeneradas que foram para casa de vegetação não sobreviveram a esta etapa. Segundo JAKŠE et al. (2003), o fato de muitos embriões não conseguirem desenvolver plantas pode ser devido à alta depressão por endogamia presente em cebola. Além disso, se as plantas que estavam sendo testadas na aclimação fossem haplóides, poderiam ser mais fracas e provavelmente não conseguiriam sobreviver a condições drásticas como a da aclimação.

A literatura também mostra a difícil manutenção dos embriões até a fase adulta. CAMPION & ALLONI (1990) conseguiram regenerar, em 6 meses, plantas de metade dos embriões produzidos; BOHANEK et al. (1995) utilizando óvulos obtiveram 0,15% de regeneração, destes foram aclimatadas com sucesso 0,02% de plantas. Utilizando ovários obtiveram taxa de regeneração de 2,32% e conseguiram aclimatar 0,81% destes. JAKŠE et al. (1996) obtiveram taxa de regeneração de 1,38% e a aclimação destes foi de 0,29%. PUDDEPHART et al. (1999) obtiveram 1,8% de embriões e aclimataram 0,8% destes. ALAN et al. (2003) obtiveram taxa de regeneração de 0,86% e conseguiram manter 0,56% das plantas. E ALAN et al. (2004) obtiveram taxa de regeneração de 4,64% e aclimataram com sucesso 3,1% plantas.

#### **4.2.2 Análise cromossômica**

O tecido da parede celular das raízes *in vitro* é um tecido mais difícil de se trabalhar que um de raiz comum, pois é um tecido mais duro, de difícil espalhamento e com poucas divisões em fase de metáfase, por isso tivemos que ter muito cuidado na preparação para termos certeza do número cromossômico. Além disso, depois do corte das raízes das plantas *in vitro*, essas plantas ficaram fracas e algumas acabaram não sobrevivendo ou contaminando devido ao alto grau de manipulação. As plantas que sobreviveram não tornaram a formar raízes *in vitro*. Outro motivo que dificultou a análise cromossômica foi que algumas plantas não enraizaram.

Foram coletadas raízes de 22 plantas das 47 regeneradas *in vitro* a partir de botões florais do experimento anterior (4.2.1.2). Na maioria não se pode ter certeza do número cromossômico. Quatro destas plantas foram consideradas como mosaicos ( $n +$

2n) e cinco foram diplóides ou duplo-haplóides (2n). Na tabela 14 encontra-se o resultado da análise cromossômica.

**Tabela 14** - Número de cromossomos de cada planta regenerada nos estádios de umbelas, tamanhos de botões florais, dias em meio de indução e genótipos.

Genótipos	Explantos	Dias de Indução	Cromossomos
2479	Umbela aberta botão médio	7	16
2592	Umbela aberta botão médio	Contínuo	16
2510	Umbela fechada botão pequeno	Contínuo	16
2510	Umbela fechada botão grande	21	16
2770	Umbela fechada botão pequeno	21	16
2770	Umbela fechada botão pequeno	14	mosaico
2753	Umbela fechada botão médio	14	mosaico
2510	Umbela aberta botão grande	contínuo	mosaico
2770	Umbela fechada botão médio	14	mosaico
2753	Umbela fechada botão grande	contínuo	S/ divisão celular s/ metáfase
2753	Umbela fechada botão médio	7	
2753	Umbela fechada botão grande	contínuo	S/ divisão celular
2753	Umbela fechada botão médio	Espermina/contínuo	S/ divisão celular
2753	Umbela fechada botão grande	contínuo	S/ divisão celular
2753	Umbela fechada botão pequeno	21	S/ divisão celular
2753	Umbela fechada botão médio	14	S/ divisão celular
2753	Umbela aberta botão médio	21	S/ divisão celular
2753	Umbela fechada botão pequeno	21	S/ divisão celular
2753	Umbela fechada botão grande	controle	S/ divisão celular
2510	Umbela fechada botão pequeno	controle	S/ divisão celular
2510	Umbela aberta botão grande	7	S/ divisão celular
2592	Umbela aberta botão grande	21/espermina	S/ divisão celular

Na figura 18 pode-se ver uma foto dos 16 cromossomos da planta 2479, regenerada de umbela aberta botão médio que ficou 7 dias em meio de indução MII.



**Figura 18** – Análise cromossômica da planta regenerada 2479 mostrando metáfase com 16 cromossomos.

Desde os primeiros trabalhos com ginogênese *in vitro* em cebola, as análises cromossômicas eram de fundamental importância para a análise da ploidia das plantas regeneradas. E, surpreendentemente, foram detectadas várias ploidias diferentes. CAMPION et al. (1992) obtiveram plantas haplóides (n), diplóides ou duplo-haplóides (2n), e tetraplóides (4n). BOHANEK et al. (1995) e JAKŠE et al. (1996) obtiveram plantas haplóides (n), diplóides ou duplo-haplóides (2n) mosaicos (n+2n) e triplóides (3n). GEOFFRIAU et al. (1997); ALAN et al. (2003) e ALAN et al. (2004) obtiveram plantas haplóides (n), diplóides ou duplo-haplóides (2n) mosaicos (n+2n) e tetraplóides (4n). Em nosso trabalho foram encontradas apenas plantas 2n (diplóides ou duplo-haplóides) e mosaicos (n+2n) (Tabela 14).

Isto mostra que a ploidia em plantas ginogênicas originadas *in vitro* é bastante variada, em nosso trabalho várias plantas foram mixoplóides (n+2n), talvez porque estas plantas foram analisadas quando ainda estavam *in vitro* e a ploidia poderia não estar bem estabelecida ainda. De acordo com JAKŠE et al. (2003), há maior probabilidade de a ploidia ser estabelecida em casa de vegetação.

Outro fator importante é o potencial para duplicação espontânea de plantas haplóides regeneradas. GEOFFRIAU et al. (1997) obtiveram dentre os regenerantes

13% de diplóides espontâneos. ALAN et al. (2004) observaram que 15% dos regenerantes eram duplo-haplóides espontâneos.

Para se ter certeza da origem (somática ou duplicação espontânea) das plantas 2n (diplóides ou duplo-haplóides) observadas nesta análise cromossômica, foi realizada a análise isoenzimática.

#### 4.2.3 Análise com isoenzimas

Para a análise isoenzimática foram testadas apenas duas plantas, pois somente estas tinham condições de serem analisadas pela metodologia adotada, devido a maior quantidade de folhas e vigor apresentados:

Planta 1: genótipo 2510, regenerada a partir de botão pequeno (0,012 g e/ou  $\geq$  3mm) retirado de umbela fechada, inoculado em meio de indução MI1 e após 45 dias (controle), transferido para meio de cultura (MI2) sem fitorregulador e suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> sacarose. Na análise cromossômica (da planta ainda *in vitro*) não foi possível determinar o número de cromossomos, pois o tecido estava muito velho e não foram encontradas divisões celulares em metáfase. Ao ser realizado o teste isoenzimático, esta planta já estava aclimatada em vaso e em casa de vegetação (Figura 19). Ela foi testada com 10 amostras de bulbos de indivíduos de AF3030 (S3C6S1F3) - é o mesmo que AF2510 (S3C6S1F2), mas com uma geração a mais colhida em bulk - que funcionaram como padrão quanto ao caráter heterozigose. Após a poda para análise a planta sobreviveu, pois possuía grande quantidade de folhas.



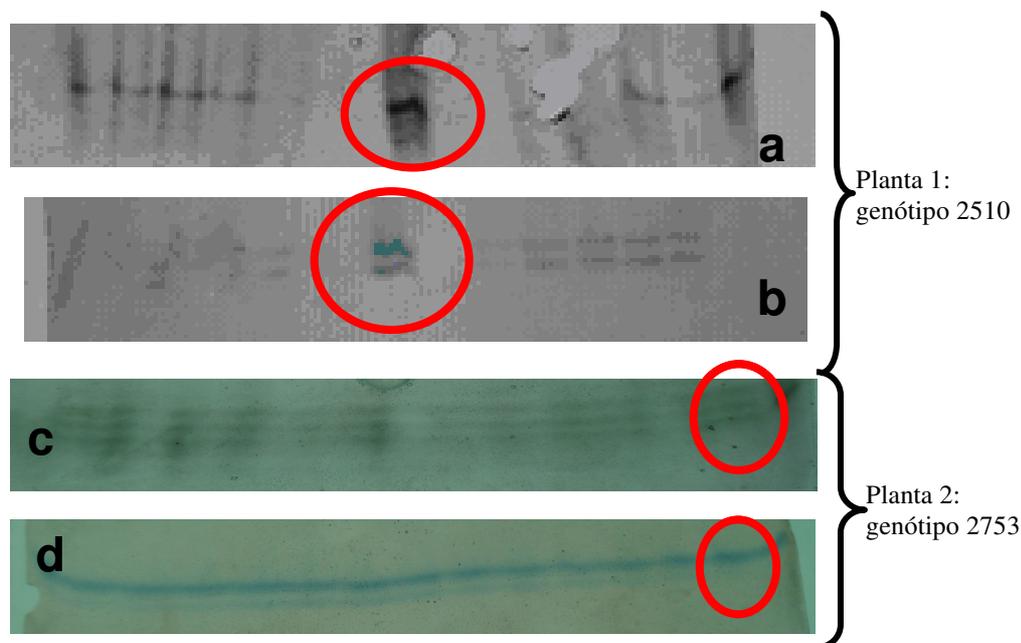
**Figura 19** – Genótipo 2510, planta regenerada a partir de botão floral, aclimatada em vaso, mantida em casa de vegetação.

Planta 2: genótipo 2753, regenerada a partir de botão grande (0,018 g e/ou  $\geq$  5mm) retirado de umbela fechada, inoculado em meio de indução MII1 continuamente. Na análise cromossômica não foi possível determinar o número de cromossomos, pois o tecido estava muito velho e não foram encontradas divisões celulares em metáfase. Quando analisada foi retirada uma folha da planta ainda *in vitro*, pois tinha vários brotos. Esta planta foi testada com 10 amostras de folhas de indivíduos AF2948 (C1) - é o mesmo que AF2753 (C0) apenas com uma geração a mais colhida em bulk - que funcionaram como padrão quanto ao caráter heterozigose. Alguns brotos que foram aclimatados não sobreviveram durante esta tentativa e após a poda para análise isoenzimática a planta necrosou por contaminação devido à alta manipulação.

A análise isoenzimática nos permitiu constatar que as duas plantas eram heterozigotas, portanto provindas de tecido somático/materno, apresentando em dois (EST e GOT) dos quatro (MDH, G<sub>6</sub>PD, EST e GOT) sistemas enzimáticos testados 2 alelos diferentes para um mesmo locus, o que foi o suficiente para esta conclusão (Figura 20). O genótipo das plantas analisadas, o tipo de explante, os dias em meio de indução e o resultado da análise isoenzimática podem ser vistos na tabela 15.

**Tabela 15** – Resultado da análise isoenzimática para as duas plantas regeneradas a partir de botões florais que foram analisadas, tipos de explantes, dias em meio de indução e genótipos.

Genótipos	Explantes	Dias de Indução	Análise Isoenzima
2753	Umbela fechada botão grande	contínuo	heterozigota
2510	Umbela fechada botão pequeno	controle	heterozigota



**Figura 20** – Análise isoenzimática. Planta 1 - genótipo 2510, regenerada a partir de botão floral; Planta 2 - genótipo 2753, regenerada a partir de botão floral. a) e c) sistema isoenzimático EST; b) e d) sistema isoenzimático GOT. Os círculos indicam as bandas das plantas regeneradas testadas mostrando os 2 alelos diferentes para um mesmo locus.

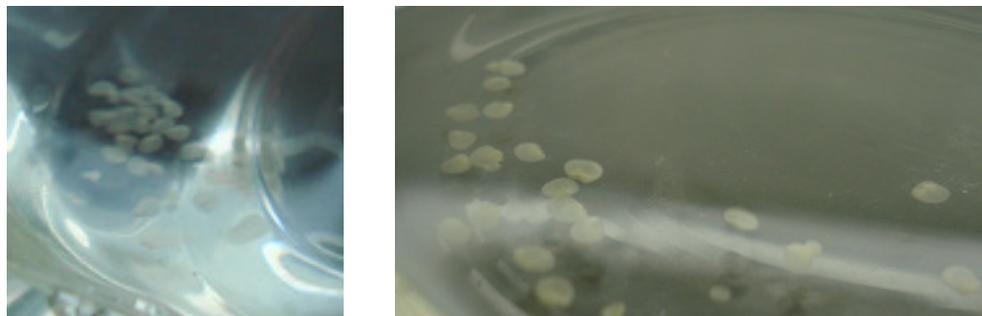
Assim como BOHANEK et al. (1995), observamos que o método de marcadores isoenzimáticos permite usar alelos fáceis de distinguir e que as bandas não sobrepõem com aquelas de outro locus. Dessa forma, é possível determinar com certeza se as plantas regeneradas via ginogênese *in vitro* de cebola são homozigotas ou heterozigotas. BOHANEK & JAKŠE (1999) analisaram as plantas diplóides regeneradas através de ginogênese em cebola com isoenzimas, que revelaram 88,2% de homozigotos. Em nosso estudo, ao contrário, as duas plantas analisadas eram heterozigotas, ou seja, diplóides (tecido somático/materno) e não duplo-haplóides espontâneas. Porém, como as plantas fracas não sobreviveram para serem analisadas, não sabemos se elas teriam sido haplóides.

#### 4.2.4 Cultura de óvulos

Como os resultados obtidos com os experimentos de botões florais não foram tão positivos, decidiu-se testar experimentos com óvulos, com os quais a probabilidade de se obter uma planta haplóide (n) é maior.

Foram inoculados, num período de quase dois meses (01/08/08 a 26/09/08), 9774 óvulos de 10 genótipos diferentes. Destes, 9414 óvulos não contaminaram, ou seja, a taxa de contaminação foi baixa (3,65%) comparada com botões florais cuja taxa

de contaminação foi de 41,27%. Na figura 21 pode-se observar óvulos do genótipo 2753 inoculados no meio de indução D (idem ao meio A, sem carvão ativado e sem ágar - meio líquido) com 20 dias de inoculação.



**Figura 21** - Óvulos de cebola em meio de cultura líquida (meio D) do genótipo 2753 com 20 dias de inoculação.

Na tabela 16 pode-se observar o número absoluto de óvulos (explantes) inoculados, juntando-se os meios (a-i) utilizados, para cada genótipo e para cada variação de tamanho de botões florais (grandes, médios e pequenos).

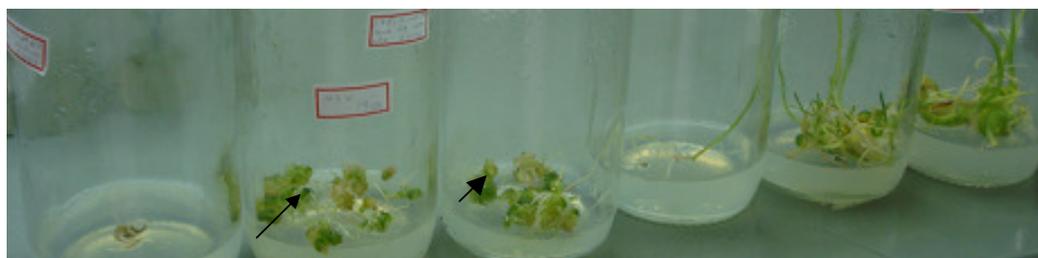
**Tabela 16** – Número de óvulos (explantes) viáveis (sem contaminação), juntando-se os meios utilizados, para cada genótipo e tamanho de botão floral.

Genótipo	Botão grande	Botão médio	Botão pequeno	Total
2592	438	288	432	1158
2895-15	576	672	528	1776
2783	223	296	344	863
2546	384	384	336	1104
2831-1	288	384	336	1008
2675	288	336	288	912
1824	240	288	336	864
2856	192	192	192	576
2831-4	192	192	192	576
2840	192	192	192	576

Assim como para o experimento utilizando botões florais, e também de acordo com a literatura (CAMPION et al., 1992; JAKŠE et al., 1996; GEOFFRIAU et al., 1997; MICHALIK et al., 2000 e GEOFFRIAU et al., 2006), observamos alta dependência de genótipos quanto à regeneração. Nas tabelas 17 a 19, encontram-se os genótipos, a quantidade de óvulos inoculados viáveis em cada meio testado (A, B, C, D, E, F, G, H, I) na presença (16hs luz e 8hs escuro) e/ou na ausência total de luz, a quantidade de calos, a quantidade de óvulos que regeneraram plantas a partir da formação prévia de calos (embriogênese indireta) ou que apresentaram embriões diretamente (Figura 22, 23 e 24).



**Figura 22** – Planta de cebola desenvolvida diretamente de um embrião de óvulo inoculado em meio A, isolado de uma umbela aberta, botão grande, genótipo 2592.



**Figura 23** - Calos organogênicos com setores verdes e gemas incipientes (setas) e plantas regeneradas a partir de cultura de óvulos isolados (frascos à direita) de cebola.



**Figura 24** - Detalhes de plantas regeneradas (embriogênese direta) a partir de células do saco embrionário de óvulos de cebola, sem a passagem por calos.

**Tabela 17** – Quantidade de óvulos viáveis inoculados em cada meio (A e B), na presença e na ausência total de luz, para cada genótipo, quantidade de calos, regenerações via calos (embriogênese indireta) e embriões diretos obtidos.

Genótipo	Meio	Óvulos viáveis	Calos	Regenerações de calos	Embriões diretos
2592	A-escuro	1158	192	-	<b>2</b>
2892-15	A-escuro	1440	120	-	-
2892-15	A-luz	96	-	-	-
2892-15	B-escuro	96	6	-	-
2892-15	B-luz	144	-	-	-
2546	A-escuro	144	22	-	-
2546	A-luz	144	15	-	-
2546	B-escuro	192	1	<b>2</b>	-
2546	B-luz	144	-	-	-
2831-1	A-escuro	288	18	-	<b>1</b>
2831	A-luz	288	57	-	-
2831	B-escuro	144	7	-	-
2831	B-luz	144	-	<b>1</b>	-
2675	A-escuro	192	20	-	-
2675	A-luz	144	7	-	-
2675	B-escuro	192	4	-	-
2675	B-luz	144	-	-	-
1824	A-escuro	144	16	-	-
1824	A-luz	144	76	-	-
1824	B-escuro	192	-	-	-
1824	B-luz	192	-	-	-
2840	A-escuro	144	-	-	-
2840	B-escuro	144	-	-	-
2831-4	A-escuro	144	15	-	-
2831-4	B-escuro	144	-	-	-
2856	A-escuro	144	55	-	-
2856	B-escuro	144	9	-	-

Luz: presença (16hs luz e 8hs escuro); escuro: ausência total de luz. MEIO A: B-5 com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado; MEIO B: idem ao meio A sem carvão ativado.

**Tabela 18** – Quantidade de óvulos viáveis inoculados em cada meio (C, D e E), na presença e na ausência total de luz, para cada genótipo; quantidade de calos, regenerações via calos (embriogênese indireta) e embriões diretos obtidos.

Genótipo	Meio	Óvulos viáveis	Calos	Regenerações de calos	Embriões diretos
2753	C-escuro	150	-	-	-
2753	C-luz	150	-	-	-
2753	D-escuro	150	6	<b>2</b>	<b>2</b>
2753	D-luz	150	-	-	-
2753	E-escuro	144	83	-	-
2753	E-luz	120	-	-	-
2546	E-escuro	288	31	-	-
2546	E-luz	192	60	-	-

Luz: presença (16hs luz e 8hs escuro); escuro: ausência total de luz. MEIO A: B-5 com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado; MEIO C: idem ao meio A, com 5g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e sem ágar (meio líquido); MEIO D: idem ao meio A, mas sem carvão ativado e sem ágar (meio líquido); MEIO E: idem ao A, com 5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado ao invés de 2 g.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 19** – Quantidade de óvulos viáveis inoculados em cada meio (F, G, H e I), na ausência total de luz, para cada genótipo; quantidade de calos, regenerações via calos (embriogênese indireta) e embriões diretos obtidos.

Genótipo	Meio	Óvulos viáveis	Calos	Regenerações de calos	Embriões diretos
2831	F-escuro	48	-	-	-
2831	G-escuro	96	6	-	-
2675	F-escuro	144	-	-	-
2675	G-escuro	96	13	-	-
1824	F-escuro	96	-	-	-
1824	G-escuro	96	20	-	-
2840	H-escuro	144	-	-	-
2840	I-escuro	144	7	-	-
2831-4	H-escuro	144	-	-	-
2831-4	I-escuro	144	65	-	-
2856	H-escuro	144	10	-	-
2856	I-escuro	144	50	-	-

Escuro: ausência total de luz. MEIO F: B-5 com 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar, e o dobro de vitaminas (10ml de tiamina HCl, 1ml de piridoxina HCl e 1ml de ácido nicotínico); MEIO G: idem ao meio F, com 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado; MEIO H: idem ao F, contendo 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup>; MEIO I: idem ao meio F, com 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup>.

Neste experimento, utilizando óvulos, foi possível obter um total de 10 plantas regeneradas ou 0,106%. No experimento utilizando botões florais, se transformarmos a porcentagem de regeneração levando em consideração que cada botão floral possui 6 óvulos, a taxa seria de 0,142%. Assim como na literatura (BOHANEC et al., 1995; GEOFFRIAU et al., 1997; MICHALIK et al., 2000), nossa porcentagem de regeneração não foi alta.

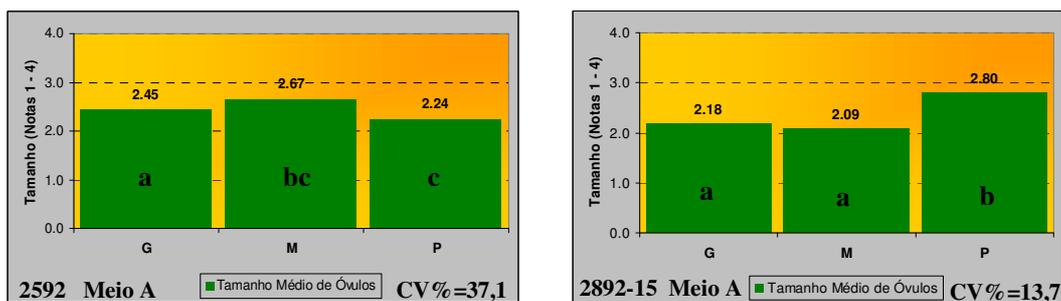
Nas tabelas 17 a 19, observa-se que os meios regenerativos (embriogênese direta e indireta) foram A, B e D, (MEIO A: B-5 modificado com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado; MEIO B: idem ao meio A sem carvão ativado; MEIO D: idem ao meio A, mas sem carvão ativado e sem ágar - meio líquido) e que neste experimento utilizando

óvulos, a alta quantidade de calos formados (991 ou 10,52%), nos leva a crer que a porcentagem de regeneração pode aumentar. Além disso, os calos provindos de óvulos têm maior chance de formar plantas haplóides do que as plantas regeneradas de botões florais, porque nos óvulos apenas o nucelo e integumentos têm tecido materno (2n). Já os botões florais possuem muito mais tecidos não haplóides (maternos ou somáticos - 2n), como os nectários, as sépalas, ovários, etc, de onde poderiam provir calos que não formariam plantas haplóides.

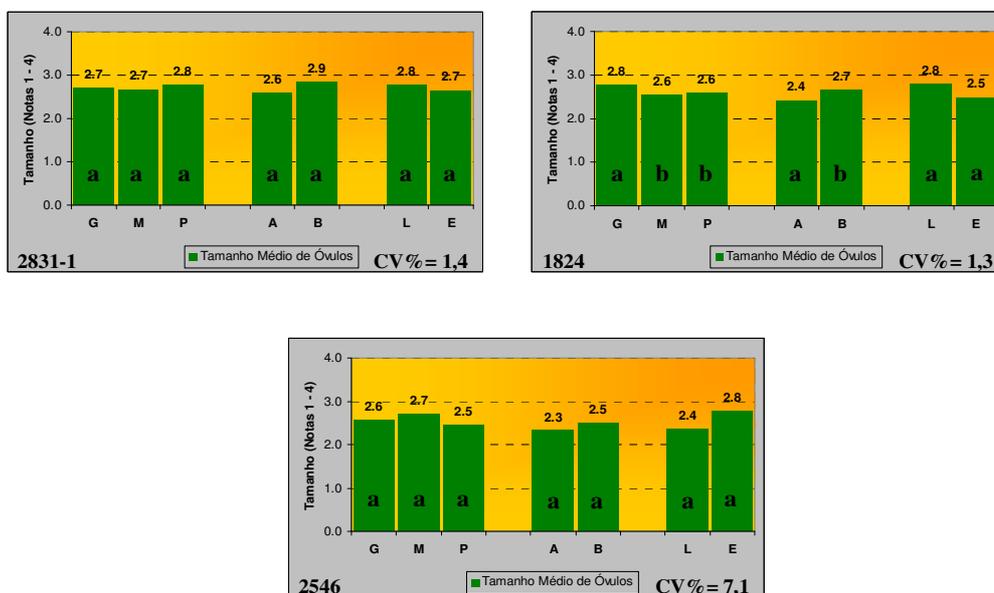
No tratamento testando-se o meio C (idem ao meio A, com  $5\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado e sem ágar - meio líquido na presença 16/hs e na ausência total de luz) não foi possível fazer avaliações, análises de notas de crescimento de óvulos e escala de cor, pois por ser meio líquido e conter grande quantidade de carvão ativado ( $5\text{ g.L}^{-1}$ ), os óvulos não eram visíveis. Também não foram observadas regenerações, nem formação de calos ou embriões para óvulos neste meio.

Para os tratamentos utilizando os meios F e G, (MEIO F: B-5 com  $4,0\text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D e  $4,0\text{ mg.L}^{-1}$  de 6-BA, contendo  $75\text{ g.L}^{-1}$  de sacarose,  $5,8\text{ g.L}^{-1}$  de ágar, e o dobro de vitaminas; MEIO G: idem ao meio F, com  $2\text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado) não foram feitos histogramas nem análise estatística, pela baixa repetibilidade obtida nos experimentos que contaminaram. Na tabela 19, comparando-se os meios F e G observa-se que os genótipos testados apenas no meio G produziram calos, provavelmente pela presença de carvão ativado que impediu a oxidação dos óvulos, já que os óvulos dos genótipos inoculados em meio F (sem carvão ativado) oxidaram.

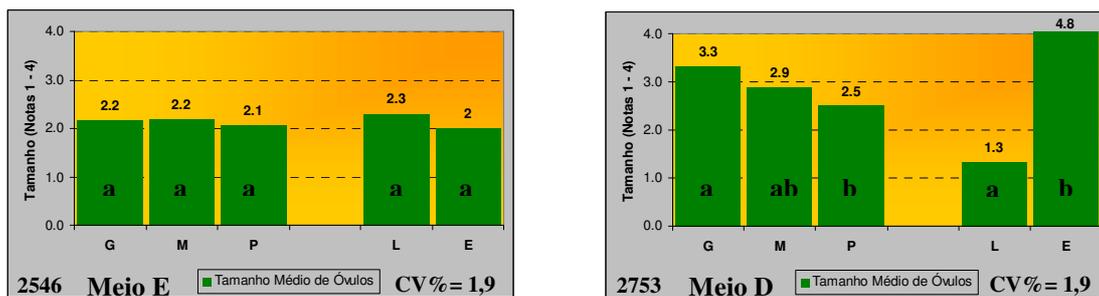
Para os demais tratamentos, foram feitos histogramas para a variável crescimento de óvulos, de acordo com os meios em que foram inoculados (A, B, D, E, H e I), tamanho de botões (G, M e P) e presença ou ausência total de luz (L e E). Esta variável não demonstrou muitas diferenças, sendo praticamente equivalente para cada genótipo, como se pode ver nas figuras 25 a 28. Destacamos o baixo valor de CV, mostrando que as diferenças estatísticas foram devido principalmente às variáveis testadas.



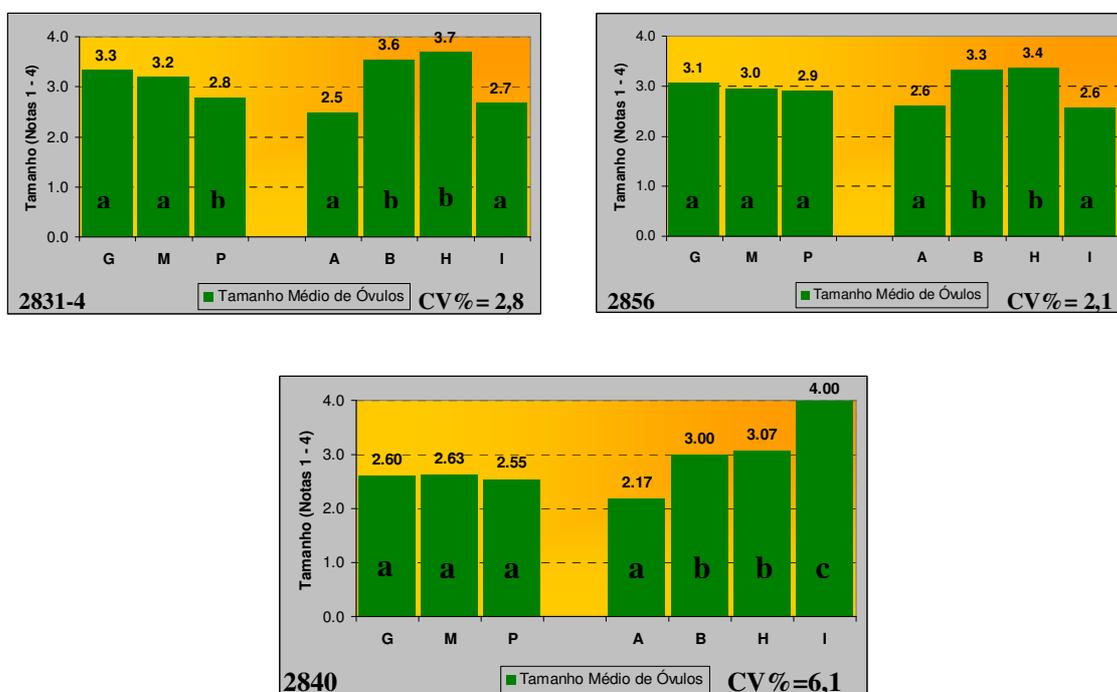
**Figura 25** - Histogramas para a variável crescimento de óvulos, no meio de cultura A (B-5 com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D e  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6-BA, contendo  $75 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose;  $5,8 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar e  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado), tamanhos de botões (grandes, médios, pequenos) na ausência total de luminosidade para os genótipos 2592 e 2892-15.



**Figura 26** - Histogramas para a variável crescimento de óvulos, nos meios de cultura (MEIO A: B-5 com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D e  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6-BA, contendo  $75 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose;  $5,8 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar e  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado; MEIO B: idem ao meio A sem carvão ativado), tamanhos de botões (grandes, médios, pequenos) e presença (16hs luz, 8hs escuro) ou ausência total de luminosidade para os genótipos 2831-1; 1824 e 2546.



**Figura 27** – Histogramas para a variável crescimento de óvulos, para tamanhos de botões (grandes, médios, pequenos), presença (16hs luz, 8hs escuro) ou ausência total de luminosidade para o genótipo 2546 no MEIO E (idem ao A, com 5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado ao invés de 2 g.L<sup>-1</sup>) e genótipo 2753 no MEIO D (idem ao meio A, mas sem carvão ativado e sem ágar - meio líquido).



**Figura 28** - Histogramas para a variável crescimento de óvulos nos meios de cultura MEIO A: B-5 com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado; MEIO B: idem ao meio A sem carvão ativado. MEIO F: B-5 com 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar, e o dobro de vitaminas (10ml de tiamina HCl, 1ml de piridoxina HCl e 1ml de ácido nicotínico); MEIO H: idem ao F, contendo 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup>; MEIO I: idem ao meio F, com 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup> tamanhos de botões (grandes, médios, pequenos), na ausência total de luminosidade para os genótipos 2831-4; 2856 e 2840.

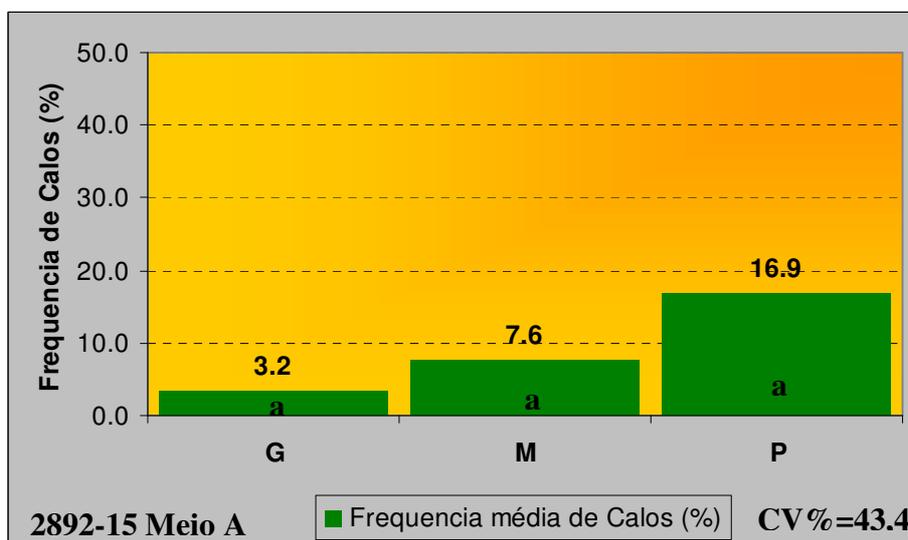
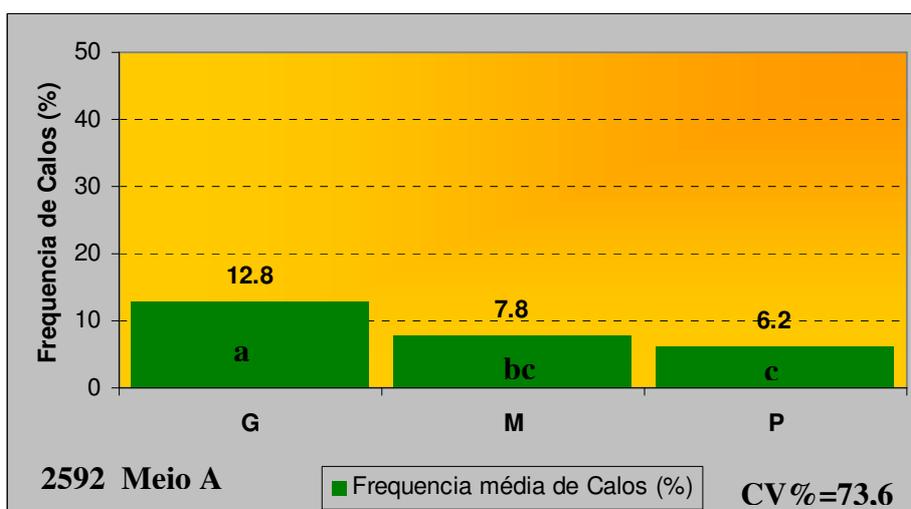
Através dos histogramas das figuras 25 a 28, nota-se que para a variável crescimento de óvulos, os tamanhos de botões (G, M, P) apresentaram comportamento de forma oscilante, ora dependendo do genótipo e meio de cultura testados, ora não mostrando diferença estatística. O mesmo ocorreu com a presença (16hs luz, 8hs escuro) e ausência total de luz (L e E), quando testadas num mesmo tratamento. E também para o tratamento testando-se os meios A e B (MEIO A: B-5 modificado com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado; MEIO B: idem ao meio A sem carvão ativado) (Figura 26), onde os genótipos 2831-1 e 2546 não apresentaram diferença estatística e para o genótipo 1824 o meio B e o tamanho grande de botão apresentaram maior tamanho de óvulos.

Nas figuras 27 e 28, observa-se diferença estatística entre os meios B, D e H, (MEIO B: idem ao meio A sem carvão ativado; MEIO D: idem ao meio A, mas sem carvão ativado e sem ágar - meio líquido; MEIO H: idem ao F, contendo 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup>), que não possuem carvão ativado, e os meios A, E e I (MEIO A: B-5 modificado com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado; MEIO E: idem ao A, com 5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado ao invés de 2 g.L<sup>-1</sup>; MEIO I: idem ao meio F, com 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup>), com carvão ativado. O carvão ativado adsorve os hormônios, a sacarose e outros componentes do meio de cultura (EBERT et al., 1993; PAN & VAN STADEN, 1998). Talvez por isso, os óvulos cresceram mais nestes meios, porém nos meios sem carvão ativado os óvulos oxidaram e formaram poucos calos, como pode ser visto na tabela 17.

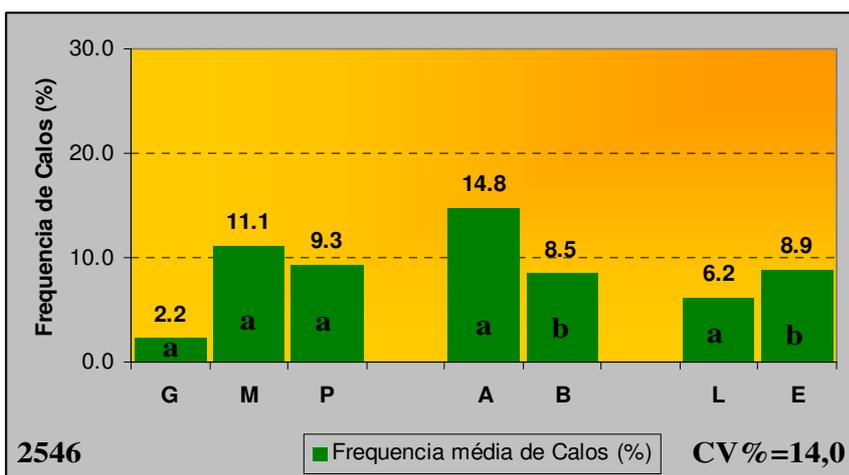
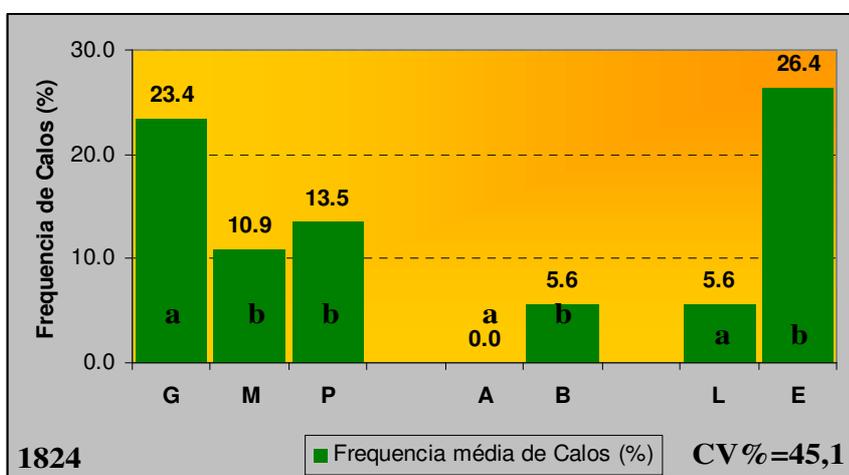
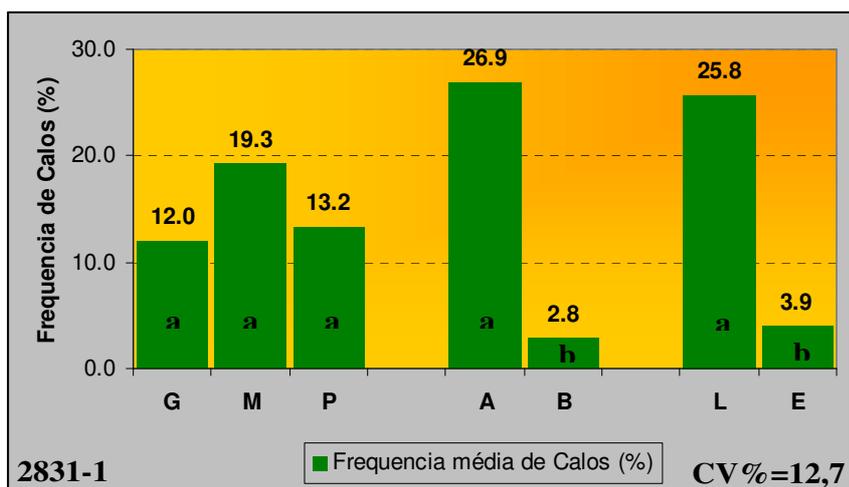
MUSIAL et al. (2005) fizeram cortes histológicos dos diferentes tamanhos de botões (grandes, médios e pequenos) inoculados *in vitro* para ginogênese em cebola, em diferentes tempos, para observar o desenvolvimento dos sacos embrionários em cada um dos estádios de desenvolvimento. Observaram que os óvulos inoculados *in vitro* continuam se desenvolvendo, pois no momento da inoculação, cada tamanho de botão estava em um diferente estágio de desenvolvimento, por exemplo: botões grandes possuíam em sua maioria sacos embrionários maduros e botões pequenos continham ainda a célula-mãe (megásporo). Conforme o tempo de cultura passava, estes estádios iam se desenvolvendo e aos 12 dias de cultura existiam mais sacos embrionários maduros nos botões pequenos que nos botões grandes. Portanto, quanto mais tempo estes óvulos ficarem em meio de cultura, maior a chance de formar embriões. Porém,

mais estudos são necessários para se dizer com certeza de qual tamanho de botão os óvulos devem ser inoculados.

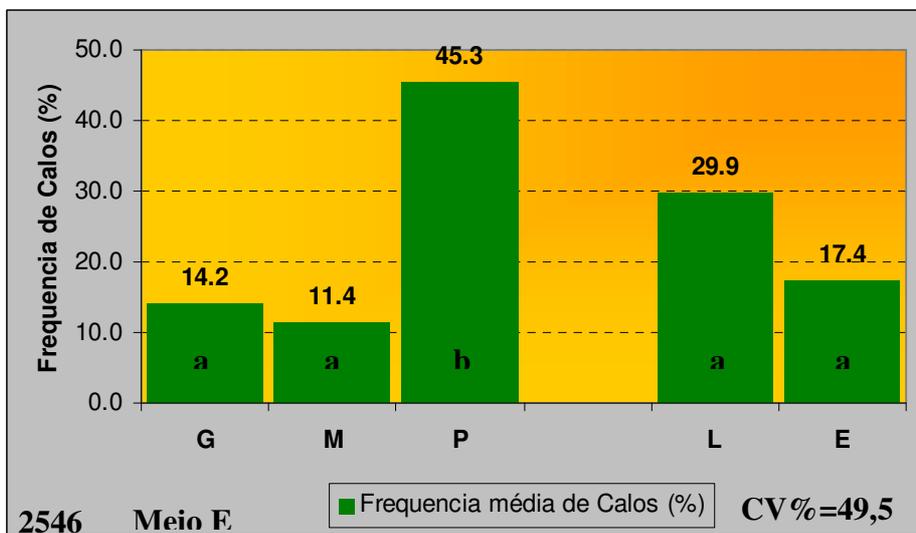
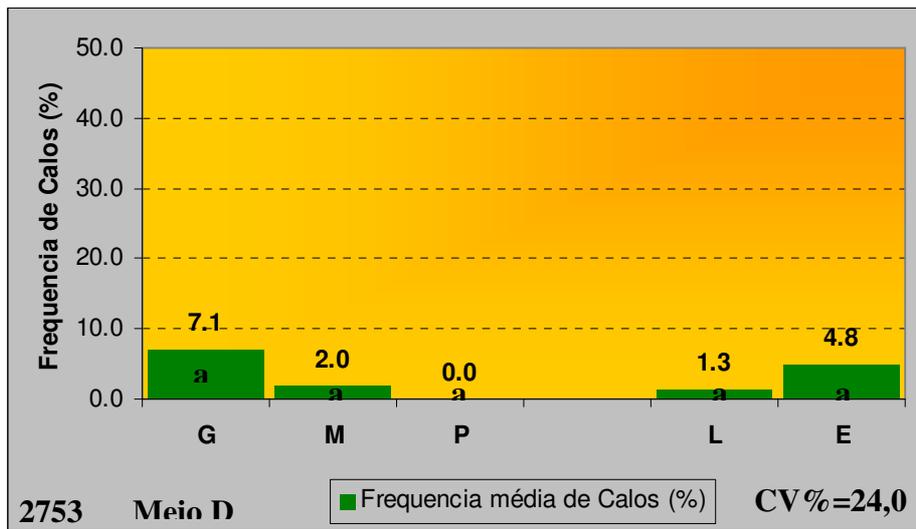
Também foram feitos histogramas para a variável porcentagem de calos, de acordo com os meios em que foram inoculados (A, B, D, E, H e I), tamanho de botões (G, M e P) e presença (16hs luz, 8hs escuro) ou ausência total de luz (L e E). Esta variável apresentou muitas diferenças estatísticas, principalmente em relação ao meio em que foram inoculados os óvulos. Novamente observa-se forte dependência de genótipo e interação meio de cultura x genótipo (Figuras 29 a 32).



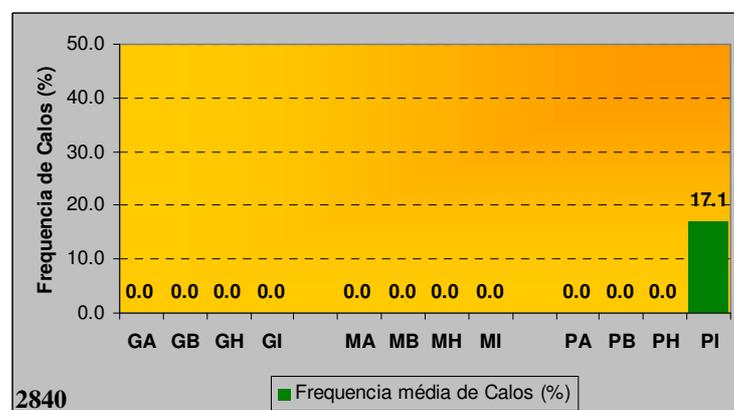
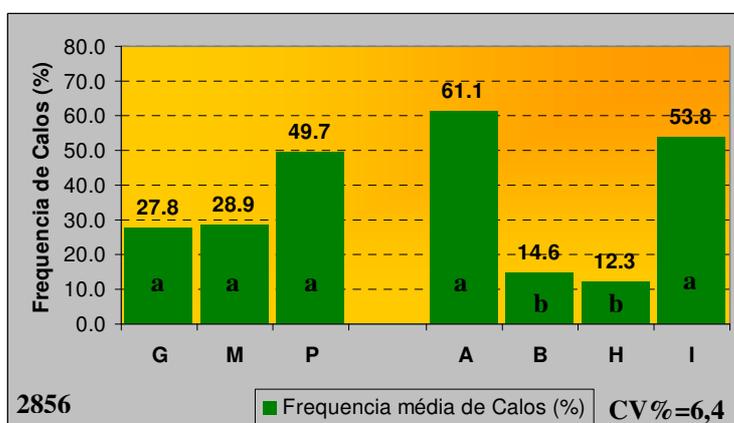
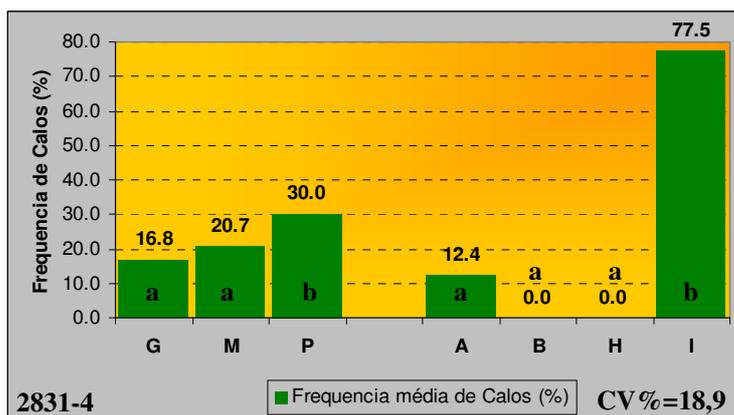
**Figura 29** - Histogramas para a variável porcentagem de calos em cebola, para o meio A (B-5 com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado), diferentes tamanho de botões (Grande, Médio, Pequeno), na ausência total de luz para os genótipos 2592 e 2892-15.



**Figura 30** - Histogramas para a variável porcentagem de calos em cebola, meios em que os óvulos foram inoculados (MEIO A: B-5 com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado; MEIO B: idem ao meio A sem carvão ativado), diferentes tamanho de botões (G, M, P) e presença (16hs luz, 8hs escuro) ou ausência total de luz (L e E) para os genótipos 2831-1; 1824 e 2546.



**Figura 31** - Histogramas para a variável porcentagem de calos em cebola, diferentes tamanho de botões (G, M, P), presença (16hs luz, 8hs escuro) ou ausência total de luminosidade para o genótipo 2753 no MEIO D (idem ao meio A, mas sem carvão ativado e sem ágar - meio líquido) e genótipo 2546 no MEIO E (idem ao A, com 5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado ao invés de 2 g.L<sup>-1</sup>).



**Figura 32** - Histogramas para a variável porcentagem de calos em cebola, meios em que os óvulos foram inoculados MEIO A: B-5 com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado; MEIO B: idem ao meio A sem carvão ativado. MEIO F: B-5 com 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar, e o dobro de vitaminas (10ml de tiamina HCl, 1ml de piridoxina HCl e 1ml de ácido nicotínico); MEIO H: idem ao F, contendo 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup>; MEIO I: idem ao meio F, com 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup> tamanhos de botões (grandes, médios, pequenos), diferentes tamanho de botões (G, M, P) na ausência total de luz para os genótipos 2831-4; 2856 e 2840.

Na figura 29, observa-se, novamente, que no meio A (B-5 modificado com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado) e na ausência total de luz o genótipo 2892-15 não apresenta diferença estatística para tamanho de botões, já para o genótipo 2592 o botão grande apresenta maior taxa de calos (12,8%).

Os meios de cultura A e B (MEIO A: B-5 modificado com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado; MEIO B: idem ao meio A sem carvão ativado), que foram os mais utilizados, mostraram respostas variáveis dependendo dos genótipos testados. Por exemplo, na figura 30, o genótipo 1824 foi mais responsivo, para % de calos, no meio B e os genótipos 2831-1 e 2546, mais responsivos no meio A.

Na figura 31 as variações testadas no meio D (idem ao meio A, mas sem carvão ativado e sem ágar - meio líquido) mostraram baixa porcentagem de calos para o genótipo 2753, provavelmente, por ser um meio sem carvão ativado, onde os óvulos oxidaram. Já o meio E (idem ao A, com 5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado ao invés de 2 g.L<sup>-1</sup>) apresentou melhores resultados de taxa de calogênese para o genótipo 2546, principalmente para botão pequeno.

Pode-se notar (Figura 32), que em geral os meios A e I (MEIO A: B-5 modificado com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado; MEIO I: idem ao meio F, com 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup>), presença de carvão ativado, foram os melhores para taxa ou frequência de formação de calos, independentemente do tamanho de botões.

As variáveis tamanho de botões (Grande, Médio e Pequeno) e presença (16hs luz e 8hs escuro) ou ausência total de luz (L e E), apresentaram diferenças estatísticas oscilantes extremamente dependentes dos genótipos e meios testados (Figuras 29 a 32).

PEREIRA et al. (2008) observaram que o carvão ativado reduziu a oxidação dos explantes de pimenta, melhorando o vigor das plantas, pois a adsorção de nutrientes gradativamente liberados para o explante favoreceu o desenvolvimento da cultura. ASHBURNER et al. (1993) controlaram a oxidação por fenóis da cultura de embriões de coco *in vitro*, suplementando o meio com 0,2% de carvão ativado.

Segundo LERCH (1981) a oxidação fenólica é um dos sérios problemas que podem dificultar o estabelecimento no cultivo *in vitro*. A liberação de compostos

fenólicos ocorre devido ao dano causado nas células durante a excisão dos explantes. Algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas; estas são responsáveis pela coloração marrom nas culturas, além de causarem a inibição do crescimento e morte dos explantes (MONACO et al., 1977).

Da mesma forma, em nosso trabalho, observamos que os meios A e I (com carvão ativado) obtiveram maior formação de calos (Figuras 29 a 32) provavelmente pela diminuição da oxidação dos óvulos, que com isso puderam ter melhor desenvolvimento. Além disso, foi observado através da avaliação da coloração dos óvulos que o escurecimento dos óvulos que ficaram marrons (oxidados) só ocorreu nos meios de cultura sem a presença do carvão ativado B, D, F e H (MEIO B: idem ao meio A sem carvão ativado; MEIO D: idem ao meio A, mas sem carvão ativado e sem ágar - meio líquido; MEIO F: B-5 com 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar, e o dobro de vitaminas; MEIO H: idem ao F, contendo 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup>).

De acordo com GEORGE (1996) o carvão ativado também possui propriedades de adsorver e reduzir a disponibilidade exógena no meio de cultura e induzir o processo de rizogênese. PAN & VAN STADEN (1998) disseram que hormônios têm grande adsorção pelo carvão ativado. E EBERT et al. (1993) observaram decréscimo de 6-BA e 2,4-D com adição de carvão ativado ao meio. Por isso, resolvemos testar os meios F, G, H e I (MEIO F: B-5 com 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, contendo 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,8 g.L<sup>-1</sup> de ágar, e o dobro de vitaminas; MEIO G: idem ao meio F, com 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado) MEIO H: idem ao F, contendo 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup>; MEIO I: idem ao meio F, com 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup>) com concentrações em dobro dos fitorreguladores e vitaminas e que mostraram melhores taxas de formação de calos (Tabela 19 e Figura 32).

Segundo DAVIES (1972) a atividade de enzimas no que diz respeito à biossíntese de fenóis, é aumentada pela luz. PAN & VAN STADEN (1998) também observaram um interessante efeito secundário do carvão ativado que é o escurecimento do meio. Como a luz aumenta a atividade de enzimas associadas à oxidação de fenóis, o escurecimento do meio pelo carvão diminui ainda mais a oxidação.

FRIDBORG et al. (1978) encontraram diferenças em cultura de *Allium* em meio com e sem carvão ativado. Segundo os autores, o meio sem carvão contém compostos fenólicos e outros metabólitos que inibem a embriogênese e morfogênese. Como

podemos observar nas figuras 29 a 32, os meios com carvão A, E, e I (MEIO A: B-5 modificado com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D e  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6-BA, contendo  $75 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose;  $5,8 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar e  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado; MEIO E idem ao A, com  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado ao invés de  $2 \text{ g.L}^{-1}$ ; MEIO I: idem ao meio F, com  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado e  $100 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose ao invés de  $75 \text{ g.L}^{-1}$ ) produzem maiores taxas de calos para a maioria dos genótipos. Além disso, SCHLOUPT (1994) observou que carvão ativado diminui a hiper-hidricidade em brotos de cebola, o que diminuiria o efeito causado pela grande quantidade de sacarose e 6-BA (IVANOVA et al., 2006) utilizados por longo tempo para indução de calos e embriões em nossos experimentos.

### 4.3 Micropropagação e Bulbificação *In Vitro* de Cebola

#### 4.3.1 Micropropagação *in vitro*

A seguir (Tabela 20) são apresentados os resultados das desinfestações testadas para cada genótipo.

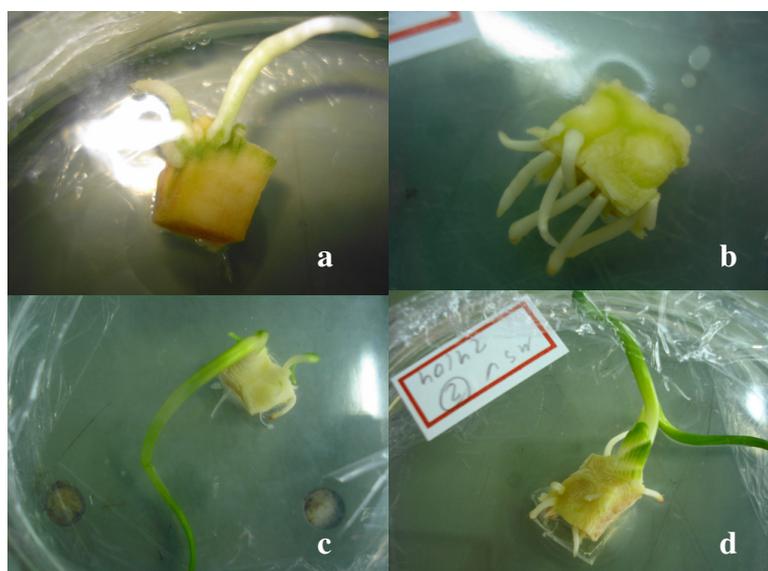
**Tabela 20** - Resultado de explantes inoculados e contaminados em cada meio de cultura (MS1, MS2 e MS3), para cada genótipo, tipo de explante e desinfecção testadas.

Genótipo	Desinfecção	Explante	MS1	Cont.	MS2	Cont.	MS3	Cont.
1824	1	A	1	(+)	1	(+)	1	(+)
1824	1	B	4	(-)	4	(+)	4	(+)
2882	2	A	1	(+)	1	(+)	1	(+)
2882	2	B	4	(+)	4	(+)	4	(+)
2696	2	A	1	(+)	1	(+)	1	(+)
2696	2	B	4	(+)	4	(+)	4	(+)
2882	3	A	2	(+)	2	1(+)	2	(+)
2882	3	B	8	(+)	8	4(+)	8	4(+)
1824	3	A	2	(+)	2	(+)	2	1(+)
1824	3	B	8	(+)	8	(+)	8	(+)
2696	3	A	2	(+)	2	(+)	2	1(+)
2696	3	B	8	(+)	8	(+)	8	(+)
2698	3	A	2	1(+)	2	(+)	2	(+)
2698	3	B	8	(+)	8	(+)	8	(+)
2778	3	A	2	1(+)	2	1(+)	2	(+)
2778	3	B	8	4(+)	8	(+)	8	4(+)
2698	4	A	1	(+)	1	(+)	1	(+)
2698	4	B	4	(+)	4	(+)	8	(+)
2778	4	A	1	(+)	1	(+)	1	(+)
2778	4	B	4	(+)	8	(+)	4	(+)

Cont.= contaminação. Para a presença de contaminantes com fungos, bactérias ou leveduras (+) e ausência (-). Desinfecções de 1 a 4, e meios de cultura MS1, MS2, MS3 vide material e métodos (3.3.1).

Resumo dos resultados de contaminação dos explantes por genótipo: Genótipo **1824**, desinfecção 1, contaminação de 73,3%; desinfecção 3, contaminação de 96,6%. Genótipo **2696**, desinfecções 2 e 3, contaminação de 100,0%. Genótipo **2882** desinfecção 2, contaminação de 100%; desinfecção 3, contaminação de 80,0%. Genótipo **2778** desinfecção 3, contaminação de 66,6%; desinfecção 4, contaminação de 100,0%. Genótipo **2698** desinfecção 3, contaminação de 96,6%; desinfecção 4, contaminação de 100,0%.

Na figura 33, podem ser vistos segmentos dos discos basais inoculados em meio de cultura com início de desenvolvimento.



**Figura 33** - Explantes de discos basais inoculados em meio de cultura com início de desenvolvimento do genótipo 2778. a) e b) explante B em meio MS1; c) explante A em meio MS3 e d) explante A em meio MS2.

Para os bulbinhos, conforme salientado, foi utilizado apenas um explante (C) devido ao reduzido tamanho do disco basal dos mesmos (0,125 cm<sup>3</sup>). As desinfestações testadas para cada genótipo encontram-se na tabela 21.

**Tabela 21** - Resultado de explantes inoculados e contaminados em cada meio de cultura (MSa, MSb; MSc; MSd; MSe; e MSf), para cada genótipo e desinfecção testadas.

G	D	a	C	b	C	c	C	d	C	e	C	f	C	g	C	h	C	i	C
2690	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	-	-	-	-	-	-
2483	6	5	-	5	1	5	3	4	3	4	2	4	1	-	-	-	-	-	-
2954	7	5	1	5	2	5	2	5	2	4	2	4	1	-	-	-	-	-	-
2917	8	5	5	4	4	4	4	-	-	-	-	-	-	4	4	4	4	4	4
2948	8	3	3	5	5	4	4	-	-	-	-	-	-	5	5	4	3	4	4

G = genótipo; D = desinfecção; C = contaminação; a = MSa; b = MSb; c = MSc; d = MSd; e = MSe; f = MSf; g = MSg; h = MSh; i = MSi. Desinfecções de 5 a 8, e meios de cultura, vide material e métodos (3.3.1).

Resumo dos resultados de contaminação dos explantes por genótipo: Genótipo **2690** desinfecção 5, contaminação de 96,0%. Genótipo **2483** desinfecção 6, contaminação de 37,0%. Genótipo **2954** desinfecção 7, contaminação de 35,7%. Genótipo **2917** desinfecção 8, contaminação de 100,0%. Genótipo **2948** desinfecção 8, contaminação de 96,0%.

Todos os explantes que não contaminaram regeneraram plantas. Foram consideradas as melhor desinfecções para bulbos as 1 e 3 (73,3% para 1 e 66,6% para 3, genótipo 2778) e para bulbinhos as 6 e 7 que obtiveram menor taxa de contaminação (37% para 6 e 35,7% para 7). A contaminação pode ter tido influência do genótipo, mas como a taxa de contaminação foi alta e a quantidade de material foi pequena não podemos afirmar qual foi a real causa da alta contaminação.

### 4.3.2 Bulbificação *in vitro*

A seguir (Tabela 22) pode-se ver a quantidade de plantas inoculadas em cada meio e as plantas que bulbificaram para cada genótipo.

**Tabela 22** - Quantidade de plantas inoculadas nos meios de bulbificação (MSA, MSB, MSC, MSD) que bulbificaram para cada genótipo.

Genótipo	MSA	MSB	MSC	MSD
1824	-	-	-	1(+)
2882	-	-	1(-)	
2698	-	1(-)	-	
2778	2(-)	1(-)	1(-)	1(-)
2948	-	-	-	1(-)
2954	6(-)	4(+)	4(+)	4(+)
2483	4(-)	4(+)	4(+)	4(+)
2690	-	-	-	1(-)

Para presença de bulbificação (+) e ausência (-). Meios de cultura MSA, MSB, MSC, MSD vide material e métodos (3.3.2).

Para os genótipos de bulbos 2882, 2698, 2778, as plantas inoculadas nos meios de bulbificação não bulbificaram porque foram contaminadas por bactéria.

Para os genótipos de bulbinhos 2948 e 2690 em meio de bulbificação MSD e 2954 e 2483 em meio de bulbificação MSA, as plantas não bulbificaram porque contaminaram por bactéria.

Pode-se dizer que, apesar da alta taxa de contaminação (talvez por estas plantas (bulbos e bulbinhos) serem providas diretamente da terra), todos os meios testados para micropropagação *in vitro* foram bons, pois todos os explantes que não contaminaram, produziram plantas. Já os meios de bulbificação ficaram com pouca repetibilidade, mas observou-se que todas as plantas inoculadas que não contaminaram nos meios de bulbificação, bulbificaram.

## 4.4 Considerações Finais em Ambas Espécies

### 4.4.1 Micropropagação e bulbificação *in vitro* de alho

Com este experimento objetivou-se determinar uma dose ideal de citocinina para o crescimento de ápices caulinares, e posterior bulbificação das plantas obtidas com aumento da concentração de sacarose.

O experimento com alho, que teve o intuito de testar diferentes concentrações da citocinina 6-BA para crescimento de ápices caulinares, mostrou que a presença de 6-BA estimulou o crescimento dos ápices, quando comparada com o controle (MS sem fitorreguladores e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose). Mesmo com uma menor taxa de bulbos chochos na ausência do 6-BA, a presença deste fitorregulador causou aumento da massa dos bulbinhos.

Para a formação de bulbinho *in vitro*, o meio MS completo (ver Anexo) acrescido de 5µM de 6-BA, inicialmente para o crescimento de ápice caulinar, e depois o aumento da dose de sacarose para 60 g.L<sup>-1</sup>, foi a estratégia que alcançou melhor resultado em nossos experimentos.

Buscou-se também, testar a combinação de duas citocininas (6-BA e KIN) para observar se ocorria melhora na taxa de crescimento dos ápices caulinares e posterior bulbificação. Constatou-se interação altamente significativa entre as citocininas 6-BA x KIN nas doses estudadas para a variável comprimento de planta. E conclui-se que podem ser utilizados meios de cultura com combinações das duas citocininas, assim como o 6-BA isolado para crescimento de ápice caulinar, com valores elevados de coeficiente de determinação R<sup>2</sup> (coeficiente de determinação).

Depois de identificada a melhor concentração de fitorreguladores para crescimento de ápices caulinares, desenvolveram-se experimentos para bulbificação das plantas obtidas. Testando-se elevadas concentrações de sacarose, observou-se que a massa seca de bulbinho na concentração de 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarose foi superior ao controle (30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose), e com razão bulbar ideal. Definiu-se que a melhor concentração de sacarose no meio de cultura MS completo, após o crescimento do ápice caulinar, deve ser de 50,0 g.L<sup>-1</sup> por reunir os valores de máxima massa seca de bulbo, razoável massa fresca, razão bulbar ideal, além de níveis razoavelmente baixos de chochamento após a cura de 40 dias em condições ambientais. Este experimento indicou que, apesar da formação dos bulbos, estes não entram em senescência, provavelmente pelo constante fornecimento de nutrientes.

Com isso, se decidiu testar meios de cultura com diferentes concentrações de MS (MS completo e ½MS), sacarose (60,0 e 70,0g.L<sup>-1</sup>) e nitrogênio (ausência e presença). A variável nota de estado fisiológico de seca de folhas durante a fase final de bulbificação foi a que melhor diferenciou os meios de cultura. Em geral, as combinações de MS e nitrogênio não mostraram efeito quando na concentração de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose para aumento de massa de bulbinho e redução de notas de folha. Concluiu-se que para aumento de massa de bulbinho simultaneamente com a senescência de folhas, durante o processo de bulbificação *in vitro*, deve-se aumentar a concentração de sacarose, fornecer nutrientes pelo MS, mas retirar os compostos nitrogenados.

#### **4.4.2 Ginogênese *in vitro* de cebola**

Os experimentos de ginogênese *in vitro* de cebola foram conduzidos em parceria com a Empresa SAKATA. Inicialmente foram testados como explantes botões florais de acordo com a literatura. No primeiro experimento foram observadas alta taxa de contaminação e hiper-hidricidade dos botões florais, além de taxa de regeneração altamente dependente do genótipo. Com isso, os botões foram transferidos aos 45 dias de indução para meio MI2: B-5 sem fitorreguladores, suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, sem fitorreguladores e com menor concentração de sacarose.

No experimento seguinte, decidiu-se por uma desinfecção mais forte (3% de hipoclorito de cálcio), com a finalidade de diminuir a taxa de contaminação. Para diminuir a hiper-hidricidade, testaram-se diferentes períodos de indução (7, 14, 21, controle e contínuo) no meio de cultura MI1: B-5 com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BA, suplementado com de 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, com base no trabalho de GEOFFRIAU et al. (2006), que afirmaram que, aos 12 dias, os óvulos já estavam induzidos para ginogênese. Porém, as taxas de contaminação (41,27%) e de hiper-hidricidade (até 100,0%) continuaram altas e dependentes de genótipo, assim como a taxa de regeneração.

Quanto às plantas regeneradas, houve dúvida quanto à fidelidade do material (haplóide ou tecido somático/materno), pois houve ocorrência de plantas regeneradas de calos, dos quais não se sabia ao certo a origem (nectários, sépalas, etc). Com as análises cromossômicas e isoenzimáticas se constatou que as plantas regeneradas testadas eram diplóides (2n) e heterozigotas (provindas de tecido somático/materno).

Devido a isso, resolveu-se, então, fazer experimentos utilizando como explantes óvulos. Os óvulos possuem o nucelo e integumentos com tecido materno (2n) e a probabilidade de se obter uma planta haplóide é maior que utilizando botões florais. Neste experimento se observou baixa taxa de contaminação (3,65%), e alta quantidade de calos formados (991 ou 10,52%), o que nos leva a crer que a porcentagem de regeneração (0,106%) ainda pode ser aumentada. Observamos também que óvulos inoculados no escuro total em meios com presença de carvão ativado não oxidaram, porém deve-se aumentar as concentrações de fitorreguladores e sacarose, necessários para se obter resposta ginogênica, que são adsorvidos pelo carvão ativado.

Quanto aos diferentes tamanhos de botões testados, pequenos (0,012 g e/ou  $\geq 3$  mm), médios (0,014 g e/ou  $\geq 4$  mm) e grandes (0,018 g e/ou  $\geq 5$  mm), os testes também mostraram alta dependência de genótipo e meio de cultura. Como os óvulos destes botões continuam a se desenvolver, depois de inoculados, acreditamos que o melhor a ser feito é uma mistura de tamanhos de botões nas placas, até surgirem trabalhos mais precisos.

Para se ter certeza da origem (tecido somático/materno ou haplóide) das plantas regeneradas, a análise isoenzimática é um método fácil, rápido e barato, com resultados precisos, que não dão margem a erros. Os melhores sistemas isoenzimáticos para serem utilizados em cebola são: EST, GOT, MDH e G<sub>6</sub>PD.

Para se identificar a ploidia destas plantas, a análise cromossômica é o método mais indicado e deve ser conduzido após a aclimatação das plantas, quando a ploidia já deve estar estabelecida.

#### **4.4.3 Micropropagação e bulbificação *in vitro* de cebola**

Este experimento foi baseado no trabalho de RODRIGUES (1994) e teve o intuito de testar a micropropagação utilizando discos basais de cebola e diferentes concentrações dos fitorreguladores 6-BA e NAA, com posterior bulbificação, testando-se diferentes concentrações de sacarose. O material vegetal (bulbos e bulbinhos) utilizado também foi gentilmente fornecido pela empresa SAKATA.

Os resultados obtidos para a bulbificação também poderiam ser utilizados posteriormente, nas plantas obtidas via ginogênese *in vitro*, para que essas plantas fossem bulbificadas e então pudessem ser mantidas e propagadas sem grandes dificuldades.

Porém a quantidade de material recebido foi pequena, e conforme o material chegava ao laboratório se observava alta contaminação após a desinfecção, para isso foram feitas várias modificações no protocolo de desinfecção com intuito de minimizar ao máximo a contaminação. Após se testar 8 diferentes desinfecções, concluiu-se que as melhores desinfecções para bulbos foram :

Para bulbos:

1) Desinfecção com 2% de hipoclorito de cálcio por 30 minutos e 2 horas no fungicida Chlorotalonil ( $6 \text{ ml.L}^{-1}$ ) para o genótipo 1824 (bulbo) com 73,3% de contaminação;

2) Desinfecção com 3% de hipoclorito de cálcio por 30 minutos e 3 horas no fungicida Chlorotalonil ( $6 \text{ ml.L}^{-1}$ ) para o genótipo 2778 (bulbos) com 66,6% de contaminação;

Para bulbinhos:

3) Desinfecção com 3% de hipoclorito de cálcio por 45 minutos e 4 horas no fungicida Chlorotalonil ( $6 \text{ ml.L}^{-1}$ ) e Oxícloreto de Cobre ( $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) para o genótipo 2483 (bulbinho) com 37% de contaminação;

4) Desinfecção com 3% de hipoclorito de cálcio por 45 minutos e 4 horas no fungicida Chlorotalonil ( $6 \text{ ml.L}^{-1}$ ), Oxícloreto de Cobre ( $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) e antibiótico Rifampicina ( $300 \text{ ml.L}^{-1}$ ) para o genótipo 2954 (bulbinho) com 35,7% de contaminação.

Como o experimento ficou com pouca repetibilidade, concluiu-se que todos os meios testados para micropropagação e bulbificação *in vitro* foram bons, pois todos os explantes que não contaminaram, produziram plantas e todas as plantas inoculadas nos meios de bulbificação que não contaminaram, bulbificaram.

## 5 CONCLUSÕES

### 5.1 Micropropagação e Bulbificação *In Vitro* de Alho

- a) Para crescimento inicial de ápice caulinar, para posterior formação de bulbinho *in vitro*, o meio MS completo acrescido de  $5\mu\text{M}$  de 6-BA é recomendado inicialmente, seguido do aumento da sacarose;
- b) Podem ser utilizados meios de cultura com combinações das duas citocininas (6-BA e KIN) e também com o 6-BA isolado para crescimento de ápice caulinar, com valores elevados de coeficiente de determinação  $R^2$ ;
- c) A melhor concentração de sacarose no meio de cultura após o crescimento do ápice caulinar deve ser de  $50,0 \text{ g.L}^{-1}$  por reunir os valores de máxima massa seca de bulbo, razoável massa fresca de bulbo, razão bulbar ideal, além de níveis razoavelmente baixos de chochamento após a cura de 40 dias em condições ambientais.
- d) Para aumento de massa de bulbinho simultaneamente com a senescência de folhas, durante o processo de bulbificação *in vitro*, deve-se aumentar a concentração de sacarose, fornecer nutrientes pelo MS, mas retirar os compostos nitrogenados.

### 5.2 Ginogênese *In Vitro* de Cebola

- a) Devido à baixa contaminação comparada com o experimento utilizando botões florais (41,65% botões florais; 3,65% óvulos) o uso de óvulos para ginogênese *in vitro* de cebola é o mais indicado;
- b) Tamanhos de botões florais diferentes (pequenos  $0,012 \text{ g e/ou} \geq 3 \text{ mm}$ , médios  $0,014 \text{ g e/ou} \geq 4 \text{ mm}$  e grandes  $0,018 \text{ g e/ou} \geq 5 \text{ mm}$ ), não apresentaram diferença significativa, por dependerem de genótipo e meio de cultura. Com isso, deve-se fazer uma mistura de tamanhos de botões;
- c) Os óvulos devem ser inoculados em meios com carvão ativado ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ ) e na ausência total da luz, para diminuir a oxidação;
- d) Os meios de cultura indicados são os A e I (MEIO A: B-5 com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D e  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6-BA, contendo  $75 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose;  $5,8 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar e  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado; MEIO I: B-5 com  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D e  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6-BA,  $5,8 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar, o dobro de vitaminas com  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado e

100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ao invés de 75 g.L<sup>-1</sup>), que contêm carvão ativado e altas concentrações de fitorreguladores e sacarose;

- e) Para diferenciação de plantas homozigotas (duplo-haplóides espontâneos) de heterozigotas (tecido somático/materno), pode-se utilizar a análise isoenzimática com os sistemas isoenzimáticos: EST, GOT, MDH e G<sub>6</sub>PD;
- f) Para verificação da ploidia deve-se fazer a análise cromossômica das plantas, após aclimação, para que a ploidia das plantas mosaico (n+2n) já esteja estabelecida.

### **5.3 Micropropagação e Bulbificação *In Vitro* de Cebola**

- a) Foram consideradas como melhores as desinfecções que obtiveram taxa de contaminação menor que 50% para bulbinhos (37% e 35,7%): Desinfecção com 3% de hipoclorito de cálcio por 45 minutos e 4 horas no fungicida Chlorotalonil (6 ml.L<sup>-1</sup>) e Oxicloreto de Cobre (2,5 g.L<sup>-1</sup>) para o genótipo 2483 (bulbinho) com 37% de contaminação; Desinfecção com 3% de hipoclorito de cálcio por 45 minutos e 4 horas no fungicida Chlorotalonil (6 ml.L<sup>-1</sup>), Oxicloreto de Cobre (2,5g.L<sup>-1</sup>) e antibiótico Rifampicina (300 ml.L<sup>-1</sup>) para o genótipo 2954 (bulbinho) com 35,7% de contaminação;
- b) Os meios testados tanto para micropropagação quanto para bulbificação *in vitro* foram eficientes, pois todos os explantes que não contaminaram, produziram plantas e bulbificaram.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A. & TIWARI, R. S. Genetic variability in garlic (*Allium sativum*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, Uttaranchal, v.74, n.3, p.164-5, 2003.

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA – GRIANUAL. Instituto FNP, São Paulo, p. 270-274, 2007.

ALAN, A. R.; BRANTS A.; COBB E. D.; GOLDSCHMIED, P. A.; MUTSCHLER, M. A.; EARLE, E. D. Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials. **Plant Science**. v. 167, p. 1055–1066, 2004.

ALAN, A. R.; MUTSCHELER, M. A.; BRANTS, A.; COBB, E.; EARLE, E. D. Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and A. Royle Stearn, **Plant Science**. v. 165, p. 1201-1211, 2003.

ANDREW, W. T. Vegetative reproduction of onions by the headset method. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**. v. 58, p. 208-212, 1951.

ARIBAUD, M.; CARRÉ, M.; MATIN-TANGUY, J. Polyamine metabolism and *in vitro* cell multiplication and differentiation in leaf explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. **Plant Growth Regulation**. v. 15, p. 143-155, 1994.

ARUMUGANATHAN, K. & EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reports**. v. 9, p. 208–218, 1991.

ASHBURNER, G. R.; THOMPSON, W. K.; BURCH, J. M. Effect of anaphthaleneacetic acid and sucrose levels on the development of cultured embryos of coconut. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 35, n.2, p. 157-163, 1993.

BARKER, A. V. & MILLS, H. A. Ammonium and nitrate nutrition of horticultural crops. **Hort. Rev.** n.2, p.395-423,1980.

BOHANEK, B.; JAKŠE, M.; IHAN, A.; JAVORNIK, B. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. **Plant Science**. v. 104, p. 215-224, 1995.

BOHANEK, B. & JAKŠE, M. Variations in gynogenic response among longday onion (*Allium cepa* L.) accessions. **Plant Cell Reports**. v. 18, p. 737–742, 1999.

BRANTS, A.; COBB, E.; EARLE, E.D.; MUTSCHLER, M.A. Production of doubled haploid onion lines via culture of immature flowers. **Report of the Vegetable Breeding Programs Cornell**. p. 28-32, 2001.

BREWSTER, J.L. Onions and other vegetables alliums. CAB International, Wallingford. p. 236, 1994.

BREWSTER, J.L. The physiology of the onion (Part 1). **Hort.Abstr.** v. 47, n. 1, p. 17-23, 1977.

BREWSTER, J.L. The physiology of the onion (Part 2). **Hort.Abstr.** v. 47, n. 2, p. 103-112, 1977.

BUSO, G. S. C.; PAIVA, M. R.; CERQUEIRA, A. A.; AMORIM, J. C.; AMARAL, Z. P. S.; DUSI, A. N.; TORRES, A. C.; BUSO, A.A. Controle de qualidade de produção de alho-semente da cultivar Amaranthe por meio de marcadores RAPD. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. EMBRAPA, Brasília, DF, agosto, 2004.

CAMARGO FILHO, W.P. & ALVES, H.S. MERCADO DE CEBOLA, QUANTIDADE E PREÇOS: prognóstico 2005. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.35, n. 5, maio, 2005a.

CAMARGO FILHO, W.P. & ALVES, H.S. Produção de cebola no mercosul: aspectos tecnológicos e integração de mercado no Brasil e na Argentina. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.35, n. 3, março, 2005b.

CAMPION, B. & ALLONI, C. Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v. 20, p. 1–6, 1990.

CAMPION, B.; FALAVIGNA, A.; SORESSI, G. P.; SCHIAVI, M. Efforts for *in vitro* androgenesis in onion (*Allium cepa* L.). In: 3° Eucarpia Allium Symposium. Wageningen, 1984. 110 p.

CAMPION, B.; AZZIMONTI, M.T.; VICINI, E.; SCHIAVI, M.; FALAVIGNA, A. Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis. **Plant Science**. v. 86, p. 97–104, 1992.

CAMPION, B.; BOHANEK, B.; JAVORNIK, J. Gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.): evidence of their homozygosity. **Theor. Appl. Genet.** v. 91, p. 598–602, 1995.

CAPLIN, S. M. & STEWARD, E. C. Effect of coconut milk on the growth of the explants from carrot root. **Science**. v. 108, p. 655-657, 1948.

CARVALHO, C. G. S.; MONNERAT, P. H.; CARVALHO, Y. Efeito de tratamento pré-plantio de bulbilhos de alho cv. Amaranthe. *Revista de Olericultura, Viçosa*. v. 15, n.1, p. 165-173, 1980.

CASTELLANE, P.D.; NICOLOSI, W.M.; HASEGAWA, M. Produção de sementes de hortaliças. FCAV/Funep. Jaboticabal, 1990. 261p.

CHOOB, V.V.; VLASOVA, T. A.; BUTENKO, R.G. Callusogenesis and morphogenesis in generative organ culture of the springflowering species of *Crocus L.* **Russian J. Plant Physiology**. v. 41, p. 712-716, 1994.

CID, L. P. B. & ILLG, R. D. . Melhoramento de alho via suspensão celular: Efeitos de interações hormonais e nutricionais sobre o crescimento da população celular. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE GENÉTICA, 1992, Rio de Janeiro. Sociedade Brasileira de Genética XXXVIII Congresso Nacional. RIO DE JANEIRO.

COSTA, T.M.P.; SOUZA, R.J.; SILVA, A.M. Efeitos de diferentes lâminas de água e doses de nitrogênio sobre a cultura do alho (*Allium sativum L.* cv. Juréia). **Ciência e Prática**, v. 17, n. 3, p. 239- 246, 1993.

DAVIES, M. E. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. *Planta*, Berlin, v.104, n.6, p.50-65, June 1972.

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

EBERT, A.; TAYLOR, F.; BLAKE, J. Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant cell Tissue Org Cult**. v. 33, p. 157-162, 1993.

FAO. FAOSTAT: agricultural data. 2003.  
<<http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>>(janeiro 2009).

FERREIRA, F. A.; CASALI, V. W. D.; SOARES, J. G. Dormência de bulbos de alho. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte. v. 12, n. 142, p. 3-7, 1986.

FERRIE, A. M. R.; PALMER, C. E.; KELLER, W. A.; THORPE, T. A. Hasploid embryogenesis. In: *In vitro* embryogenesis in plants. (eds.). Kluwer Acad. Publishers. Netherlands, p. 309-344, 1995.

FONTOURA, L. F. M. As relações de produção e a produção do espaço agrário em São José do Norte. 1994. 126f. Dissertação (Mestrado em Sociologia) – Curso de Pós-graduação em Sociologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FRIDBONG, G.; PEDERSEN, M.; LANDSTROM, ERIKSSON, T. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiol Plant**. v. 43, p. 104-106, 1978.

GABELMAN, W.H. F1 hybrids in vegetable production. In: Proceedings of the 19<sup>th</sup> International Horticultural Congress, 3., Warsaw, Poland, p.419-428, 1974.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research** v.50, p. 151-158, 1968.

GARDNER, C.O.& EBERHART, S.A. Analysis and interpretation of the variety cross diallel and related populations biometrics. v. 22, p. 439-52, 1966.

GAUTHERED, R. J. Culture de tissue cambial. **Compte Rendu Acad. Sci.**, Paris, v.198, p.2195-6, 1934.

GEOFFRIAU, E.; KAHANE, R.; RANCILLAC, M. Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.). **Euphytica**. v. 94, p. 37-44, 1997b.

GEOFFRIAU, E.; KAHANE, R.; BELLAMY, C.; RANCILLAC, M. Ploidy stability and *in vitro* chromosome doubling in gynogenic clones of onion (*Allium cepa* L.). **Plant Science**. v. 199, p. 201–208, 1997a.

GEOFFRIAU, E.; KAHANE, R.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamines are involved in the gynogenesis process in onion. **Physiologia plantarum**. v. 127, p. 119-129, 2006.

GIBSON, M. Dihaploid plant product from ovule culture sugar beet. **Proc. N. D. Acad. Sci. Diol. Sei**. v. 36, p. 171-175, 1988.

GUHA, S. & JOHRI, B.M. *In vitro* development of ovary and ovule of *Allium cepa* L., **Phytomorphology**. v. 16, p. 353–364, 1966.

GUHA, S. & MAHESHWARI, S. C. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. **Nature**. v. 204, p. 497, 1964.

GUHA, S. & MAHESHWARI, S. C. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. **Ibid**. v. 212, p. 97-98, 1966.

HABERLANDT, G. Kulturversuche mit isolierten. **Pflanzenzellen**, Sitzungsber. Akad. Wiss, Wien, v.111, p. 62-9, 1902.

HAQUE, M. S.; WADA, T.; HATTORI, K. High frequency shoot regeneration and plantlet formation from root tip of garlic. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v.50, p.83-89, 1997.

HAVEL, L. & NOVÁK F. J. Regulation of Somatic Embryogenesis and Organogenesis in *Allium carinatum* L. **J. Plant Physiol.**, Checolosvakia, v.132, p. 373 – 377, 1986

HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **Universit California Agricultural Experimental Station**. Circ. n.347, p. 1-39, 1938.

HOLDSWORTH, M. & HEATH, O.V.S. Studies in the physiology of thr onion plant. IV. The influence of day-enght and temperature on the flowering of the onion plant. **J.Exp.Bot.** v. 1, p. 353-375, 1950.

HONKANEN, J.; AAPOLA A.; SEPPANEN, P.; TORMALA, T.; WIT, J. C.; ESENDAM, H. F.; STRAVERS, L. J. M.; DE WIT, J. C. Production of doubled haploid *Gerbera* clones. **Acta Horticultural.** v. 300, p. 341-346, 1992.

HOU, A.; GEOFFRIAU, E.; PEFFLEY, E.B. Esterase isozymes are useful to track introgression between *Allium fistulosum* L. and *A. cepa* L. **Euphytica.** v. 122, p. 1-8, 2001.

HUSSEY, G. *In vitro* propagation of the onion *Allium cepa* by axillary and adventitious shoot proliferation. **Scientia Hort.** v. 9, p. 227-236, 1978.

IBGE. Banco de dados agregados. 2001.

<[www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=11&i=P](http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=11&i=P)> (janeiro 2009).

IEA - Instituto de Econômia Agrícola 2008. <[www.iea.sp.gov.br](http://www.iea.sp.gov.br)> (janeiro de 2009).

ILLG, R.D.; SIQUEIRA, W.J.; SONDAHL, M.R.; LISBÃO, R.S.; FORNAZIER, J.B.; DALLACQUA, A.N.; SILVEIRA, T.J. Cultura de tecidos como estratégia para o melhoramento do alho. In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 1983, Rio de Janeiro. **Resumos**, 125 p.

ILLG, R.D. Variação Somaclonal. In: TORRES, A. C.: CALDAS, L. S. (eds.). Técnica e aplicação de cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/Embrapa – CNPH, 1990. p. 287-295.

ILLG, R. D. & SIQUEIRA, W. J. Variação somaclonal em alho. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, MG, Brasil, v. 12, n.142, p.12-17. 1986.

ILLG, R. D. Alho (*Allium sativum* L.): Produção de Microbulbilhos de alta qualidade. In: Biofábricas: Produção industrial de plantas *in vitro* (ed.) Lee Sheng Gerald, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Centro de Ciências Agrárias, Araras, SP., p. 52-61, 1995.

IVANOVA, M., NOVÁK, O., STRAND, M., VAN STADEN, J., Endogenous cytokinins in shoots of *Aloe polyphylla* cultured *in vitro* in relation to hyperhydricity, exogenous cytokinins and gelling agents. **Plant Growth Regulation** v. 50, p. 219-230, 2006.

JAKŠE, M.; BOHANEK, B.; IHAN, A. Effect of media components on the gynogenic regeneration of onion (*Allium cepa* L.) cultivars and analysis of regenerants. **Plant Cell Reports**. v. 15, p. 934-938, 1996.

JAKŠE, M.; HVEY, M. J.; BOHANEK, B.; Chromosome doubling procedures of onion (*Allium cepa* L.) gynogenic embryos. **Plant Cell Reports**. v. 21, p. 905-910, 2003.

JONES, H.A. & CLARKE, A.E. A natural amphidiploid from an onion species hybrid. **Journal of Heredity**. v. 33, p. 25-32, 1942.

JONES, H.A. & CLARK, A.E. Inheritance of male-sterility in the onion and the production of hybrid seed. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, New York, v.43, p.189-194, 1943.

JONES, H.A. & EMSWELLER, S.L. A male-sterile onion. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**. v. 34, p. 583-585, 1936.

JONES, H.A. & MANN, L.K. Onions and their allies: botany, cultivation and utilization. (Eds.). Leonard Hill. London. 1963. 286p.

KAHANE, R.; RANCILLAC, M.; LA SERVE, B. T. Long-term multiplication of onion (*Allium cepa* L.) by cyclic shoot regeneration *in vitro*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v. 28, p. 281-288, 1992.

KELLER, J. Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). **Euphytica**. v. 47, p. 241-247, 1990.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. e BUSO, J.A. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI, Parte II, v.2, p.519-531, 1999.

KLEIN, M. & KORZONEK, D. The relationship between flower size and development stage of (*Allium cepa* L.) umbels. **Acta Biologica Cracoviensis**, series Bot.41, p. 185-192, 1999.

KOTLINSKA, T.; HAVRANEK, P.; NAVRATILL, M.; GERASIMOVA, L.; PIMAKHOV, A.; NEIKOV, S. Collecting onion, garlic and wild species of *Allium* in Central Asia, USSR. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n. 83-84, p. 31-32, 1991.

KOUL, A.K. & GOHIL, R.N. Causes averting sexual reproduction in *Allium sativum* Linn, **Cytologia**. v. 35, p. 197-202, 1970.

LERCH, K. Cooper monooxygenases: tyrosinase and dopamine b-monooxygenase. In: SIEGEL, H. (ed.). Metal íons in biological systems. Maechel Deckker, p.143-186, 1981.

LISBÃO, R.S.; SIQUEIRA, W.J.; FORNASIER, J.B.; TRANI, P.E. **O melhoramento de plantas no Instituto Agrônômico-IAC**, Campinas, p.222-253, 1993.

LIU, Z. H.; WANG, W.C.; YAN, S. Y. Effect of hormone treatment on callus formation and endogenous indoleacetic acid and polyamine contents of soybean hypocotyl cultivated in vitro. **Bot. Bull. Acad. Sin.** v. 38, p. 171-179, 1997.

MACHADO, A. A. & ZONTA, E. P. Manual do SANEST: Sistema para análise estatística para microcomputadores. Pelotas, UFPel, 102 p. 1995.

MAGALHÃES, J. R. Nutrição mineral de alho. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.12, n. 148, p. 20-30, Outubro, 1986.

MALUF W. R. 1999. **Melhoramento de cebola (*Allium cepa* L.)**. Lavras: UFLA. 17p. (Apostila).

MANN, L. K. Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb developement. **Hilgardia**. v. 21, n. 8, p. 195-251, 1952.

MARQUELLI, W.A. & SILVA, W.L.C. Resposta da cultura do alho submetida à diferentes regimes de água no solo em dois estádios de desenvolvimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 30., 2001, Foz do Iguaçu. [Anais]. Foz do Iguaçu: SBEA-UNIOESTE, 2001. CD-Rom.

MARTINEZ, E. L.; AGUERO, C. B.; LOPEZ, M. E.; GALMARINI, C. R.; Improvement of *in vitro* gynogenesis induction in onion (*Allium cepa* L.) using polyamines. **Plant Science**. v. 156, p. 221-226, 2000.

MARTÍN-URDÍROZ, N. GARRIDO-GALA, J., MARTÍN, J., BARANDIARAN X. Effect of light on the organogenic ability of garlic roots using a one-step in vitro system. **Plant Cell Rep.**, Espanha, v.22, p.721-724, 2004.

Mc COLLUM, G. D. Onion and allies. In: SIMMONDS, N. W. Evolution of crop plants. London, Longman. 1976, p. 186-190.

MELO, J.P.L. & OLIVEIRA, A.P. Produção de alho em função de diferentes níveis de água e esterco bovino no solo. **Horticultura Brasileira**. v. 17, n. 1, p. 11-15, 1999.

MELO, P.C.T.; RIBEIRO, A.; CHURATA-MASCA, M.G.C. Sistemas de produção, cultivares de cebola e seu desenvolvimento para as condições brasileiras. In: Seminário Nacional de Cebola, 3 (Anais), Piedade, SOB/DIRA, Sorocaba, Jaboticabal/Sorocaba, p.27-61, 1988.

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

MENEZES SOBRINHO, J.A. **Instruções Técnicas da Embrapa Hortaliças, Cultivo do alho (*Allium sativum*)**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1997, 23 p.

MESSIAN, C. M.; YOUCEF-BENKADA, M.; BEYRIES, A. Rendement potential et tolerance aux virus chez l'ail (*Allium sativum* L.). **Agronomie** v.1, n.9, p. 759-762, 1981.

MICHALIK, B.; ADAMUS, A.; NOWAK, E. Gynogenesis in Polish onion cultivars. **J. Plant Physiology**. v. 156, p. 211-216, 2000.

MOHAMED-YASSEN, Y.; SPLITTSTOESSER, W. E.; LITZ, R. E. *In vitro* shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 36, p.243-247, 1994.

MONACO, L. C.; SÖNDAHL, M. R.; CARVALHO, A.; CROCOMO, O. J.; SHARP, W. R. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Berlin: Springer-verlag, p.109-126, 1977.

MORAES-FERNANDES, M. B. B. Obtenção de plantas haplóides através de cultura de anteras. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: EMBRAPA/ABCTP, p.311-332, 1990.

MORICONI, D.N.; CONCI, V.C.; NOME, S.F. Rapid multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) *in vitro*. **Phyton**. v. 51, p. 145-151, 1990.

MUKHAMBETZHANOV, S. K. Culture of nonfertilized female gametophytes *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v. 48, p. 111-119, 1997.

MULLER, J.J.V. & CASALI, V.W.D. Produção de Sementes de Cebola. Boletim Técnico EMPASC, Florianópolis, n. 16, p. 64, 1982.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, California, v.15, p. 473-497, 1962.

MUREN, P. Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. **Hortscience**. v. 24, p. 833–834, 1989.

MUSIAL, K.; BOHANEC, B.; JAKŠE, M.; PRZYWARA, L. The development of onion (*Allium cepa* L.) embryo sacs *in vitro* and gynogenesis induction in relation to flower size. **In vitro Cell, Development Biology - Plant**. v. 41, p.446-452, 2005.

PAN, M. J.& VAN STADEN, J. The use of charcoal in *in vitro* culture - A review. **Plant Growth Regulation**. v.26, p. 155-163, 1998.

PAVLOVA, M. K. Culture of unfertilized gynaecia and seedbuds: Potential and prospects. **Selskohozaistvennaya Biologiya**. v. 1, p. 27-33, 1987.

PEIWEN, X., SHISONG, Q., HENGYING, L., JIE, Z., JINBIN, S., BAOYONG, H., WEI, YINGKUI, Q. Study on conservation of the virus-eliminated garlic germplasm resources. International Symposium on Biotechnology application in horticultural crops, China 4 – 8 September. (2000).

PEREIRA J. E. S.; GUEDES, R.S.; COSTA, F.H.S.; SCHMITZ, G.C.B Composição da matriz de encapsulamento na formação e conversão de sementes sintéticas de pimenta-longa. **Horticultura Brasileira**. v. 26, p.93-96, 2008.

PETERS, J.A.; BOBROWSKI, V.L.; ROSINHA, G.M.S. Produção de haplóides e duplo haplóides. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, v.2, 1999.

PIKE, L.M. Onion breeding. In: BASSET, M.J. (ed). Breeding Vegetable Crops, Westport, AVI Publishing Co., 1986. Chapter 10, p.357-394.

PONCHET, M.; MARTIN-TANGUY, J.; MARAIS, A.; MARTIN, C. Hydroxycinnamoyl acid amides and aromatic amines in the inflorescence of some Araceae species. **Phytochemistry**. v. 21, p. 2865-2869, 1982.

PUDDEPHAT, I.J.; ROBINSON, H.T.; SMITH, B.M.; LYNN, J. Influence of stock plant pretreatment on gynogenic embryo induction from flower buds of onion. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v. 57, p. 145–148, 1999.

RACCA, R. W.; ABRIL, A.; NOME, S. F.. Microbulbificación “in vitro” em ajos de sanidad controlada. In: 12º. Congresso Latino de Horticultura, Santa Fé, Argentina, Resumen, p.48, 1989.

RAVNIKAR, M.; ZEL, J.; PLAPER, I.; SPACAPAN, A. Jasmonic Acid Stimulates Shoot and Bulb Formation of Garlic In Vitro. **Journal of Plant Growth Regulation**, Slovenia, v.12, p.73-77, 1993.

REICHART, A.; NOVAK, F.J.; TANASCH, L. *In vitro* plant regeneration from leaf explants in garlic (*Allium sativum*). In: 4<sup>th</sup> EUCARPIA ALLIUM SYMPOSIUM, 1988.

RESENDE, G.M. & SOUZA, R.J. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio sobre a produtividade e características comerciais do alho. **Horticultura Brasileira**. v. 18, p. 759-760, 2000. Suplemento.

RIEKELS, J.W. The influence of nitrogen on the growth and maturity of onions grown on organic soil. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, New York, v.97, n.1, p.37-41, 1972.

RODRIGUES, B. M. Micropropagação e bulbificação in vitro de cebola (*Allium cepa* L.). 109f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Área de concentração em genética e melhoramento de plantas. Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Lavras, 1994.

SAN NOEUM, L. H. Haploids d' *Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d' ovaries non fécondes. **Ann Amelior. Plant**. v. 26, p. 751-754, 1976.

SAWAZAKI, H.E. Caracterização da diversidade genética em plantas de citros, palmeiras e brássicas através de isoenzimas e RAPD. Campinas, 1995. 118p. Tese (Doutorado) - UNICAMP, 1995.

SCHLOUPT, R. M. Plant regeneration *in vitro*, characterization and control of vitrification and somaclonal variation in onion (*Allium cepa* L.) Tese PhD, Universidade III, Urbana, III., 128p.1994.

SEIGNER, E. Conventional breeding and biotechnology join forces on the way to healthy plants. **Monatsschrift fur Brauwissenschaft**. v. 45, p. 242-251, 1992.

SIBOV, S. T. & ILLG, R. D. Otimização do processo de obtenção de microbulbilhos de alho (*Allium sativum* L.) através da cultura de meristema *in vitro*. III Reunião Paulista de Iniciação Científica em Ciências Agrárias. Universidade de Taubaté. Anais, p. 54, 1992.

SIQUEIRA, W. J.; MEDINA FILHO, H. P.; LISBÃO, R. S.; FORNASIER, J. B. Caracterização isoenzimática e morfológica de clones e introduções de alho. **Bragantia**, Campinas, v.44, n.11, p.357-374, 1985.

SIQUEIRA, W.J.; TAVARES, M.; TRANI, P.E. Variedades de alho para o Estado de São Paulo. **Boletim Técnico Instituto Agrônomo**, Campinas, p. 165, 1996.

SKOOG, F. & MULLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plants cultured “in vitro”. In: SYMPOSIUM OF SOCIETY OF EXPERIMENTAL BIOLOGY, v. 11, p. 118-131, 1957.

SMITH, B. M.; GODWIN, R. M.; HARVEY, E.; WERNER, C. P. Gynogenesis from whole flower buds in bulb onions (*Allium cepa* L.) and leeks (*Allium porrum* L.). **Journal of Genetetic Breeding**. v. 45, p. 353–358, 1991.

SMITH, R. H. & MURASHIGE, T. *In vitro* development of isolated shoot apical meristem of angiosperms. **American Journal of Botany**. v. 57, p. 562-568, 1970.

SOUZA, R.J. & CASALI, V.W.D. Pseudoperfilhamento – Uma anomalia genético-fisiológica em alho. **Informe Agropecuário**, v. 12, n. 142, p. 36-41, 1986.

STEWART, F. C.; MAPES, M. O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures growth from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, Baltimore, v.45, p. 705-8, 1958.

SVIRSHCHEVSKAYA, A. M. & BROMOTOV, V. E. Features of regeneration following gynogenesis in sugarbeet. **Doklady-Akademii- Nauk-Belarusi**. v. 38, p. 57–59, 1994.

SWAHN, J.O. The lore of spices – their history, nature and uses around the world. (eds.). Barnes & Noble. New York, 1997. 208p.

TAIZ, L.& ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 450 - 540, 2004.

TAVARES, M.; TRANI, P.S.; SIQUEIRA, W.J. Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas. Boletim Técnico IAC n. 200, Campinas, v. 6, p.175-176, 1998.

TORRES, A. C.; FAJARDO, T. V.; DUSI, A. N.; RESENDE, R. O.; BUSO, J. A. Shoot tip culture and thermotherapy in recovering vírus free plants of garlic. **Horticultura Brasileira**, Brasília. v. 18, n. 3, p. 192-195, novembro, 2000.

TRANI, P.E.; TAVARES, M.; SIQUEIRA, W.J.; BISÃO, L.G.; LISBÃO, R.S. Culturas do alho – Recomendações para seu cultivo no Estado de São Paulo. Boletim Técnico n. 170 IAC, Campinas, p. 39, 1997.

VAUGHAN, J.G. & GEISSLER, C.A. The new Oxford book of food plants. (eds.). Oxford University. New York, 1997. 239p.

VASCONCELLOS, E.F.C.; SCALOPI, E.J.; KLAR, A. A influência da irrigação e adubação nitrogenada na precocidade e superbrotamento” da cultura do alho (*Allium sativum*, L.). **O Solo**, v. 63, n. 2, p. 15-19, 1971.

VAVILOV, N.I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. In: *Onion And Their Allies: Botany, Cultivation and Utilization*. (eds.). Leonard Hill Books. London, 1963. 286p.

VILELA, N.J.; MAKISHIMA, N.; VIEIRA, R.C.M.T.; CAMARGO FILHO, W.P.; MADAIL, J.C.M.; COSTA, N.D.; BOEING, G.; VIVALDI, L.F.; WERNER, H. Identificação de sistemas de produção de cebola nos principais Estados produtores: relatório final de pesquisa - subprojeto 13.2001.865- 07. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2002.

WALKEY, D. G. A. & ANTILL, D. N. Agronomic evaluation of virus-free and virus infected garlic (*Allium sativum* L.). **Journal Hort. Science**. v.64. n.1, p. 53-60, 1989.

WENDELBO, P. Alliaceae. In: RECHINGER, K.H., (Eds.). **Flora Iranica**. Austria: Graz, p.76-100, 1971.

WENDEL, J.E. & WEEDEN, N. F. Visualization and Interpretation of plant Isozymes. In: SOLTIS, D. E. & SOLTIS, P.S. (eds.), *Isozymes in Plant Biology*, p. 16-45. Dioscorides Press, Oregon. 1989.

WHITE, P. R. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial medium. **American Journal of Botany**, Baltimore, v.26, p. 59-64, 1939.

YURI, J. E.; MOTA, J. H.; SOUZA, R. J.; RESENDE, G. M.; PASQUAL, M. Vernalização do alho para cultivo *in vitro*. **Horticultura Brasileira**. v.22, n. 3, 2004.

ZEVEN, A.C. Landraces: a review of definitions and classifications. **Euphytica**, Wageningen, v.104, p.127-139, 1998.

## 7 ANEXOS

### 7.1 Anexo 1 – Tabelas

**Tabela 1** – Material vegetal utilizado nos experimentos *in vitro* de cebola com as respectivas características individuais, de interesse ao programa de melhoramento genético fornecido pela empresa SAKATA SEED SUDAMERICA LTDA.

Material vegetal	Descrição das características individuais
AF2592	População oriunda do cruzamento de cebolas Baia e cebola Argentina. População adaptada ao NE, com excelente casca e resistência a bulbificação prematura. Excelente conservação pós-colheita e adaptação a épocas quentes
AF1824	Variedade de polinização aberta (P.A.) de cebola Crioula, com excelente retenção de casca e conseqüente conservação pós-colheita, bastante adaptada à região Sul e recomendada para cultivos tardios no Sudeste
AF2753	População de cebola tipo Baia, com boa resistência a doenças foliares e raiz rosada, com ampla adaptação no Nordeste
AF2125	F1 de cebola tipo Grano, com bom desempenho na região sudeste do Brasil
AF2479	Cebola tipo baia, com alta capacidade geral de combinação.
2477	Linhas de cebola baia, de ciclo intermediário, selecionada para plantio tardio no Sul do Brasil
2684	Linha derivadas da cebola tipo Grano.
2565	Linha derivada de cruzamento de cebola Baia x Grano, visando ampliar variabilidade genética de baia
2752	Linhas derivada de cebola crioula, de ciclo tardio e com ótima conservação pós-colheita
2510	Linhas de cebola baia, selecionada para região sul do Brasil. Boa cerosidade de folha e resistência a doenças foliares

Continua...

Continuação...

2135; 2770; 1494 e 2140	Linhas selecionadas para verão em Bragança Paulista, visando seleção para Nordeste do Brasil.
2892-15	Boa resistência a bulbificação prematura População oriunda de cruzamento Super Precoce x Grano
2546	População oriunda do cruzamento entre Super Precoce x Early Red (cebola roxa)
2831-1; 2675; 2840; 2856; 2696; 2698 e 2831-4	Linhas de cebola tipo Crioula
2778; 2882 e 2690	Linhas de cebola tipo Super Precoce
2948	Cultivar OP de cebola BRISA IPA-12
2483	População de cebola roxa (Early Red)
2954	Linha oriunda de híbrido tipo Grano
2917	Linha oriunda de IPA-10 (variedade OP de cebola roxa do IPA)

**Tabela 2** – Protocolo utilizado para preparo do Gel para análise isoenzimática.

Produto	Quantidade de gel de corrida	Quantidade de gel de sobreposição
Acrilamida	2,5ml	0,58ml
Tampão Tris pH 8,8	1,5ml	-
Tampão Tris pH 6,8	-	0,36ml
Água	3,92ml	2,0ml
P. A 10%	0,34ml	0,25ml
Tmed 10%	0,34ml	0,25ml

**Tabela 3** – Protocolo utilizado para isoenzima Esterase (EST) (E.C. 3.1.1.1), para 50ml.

Produto	Quantidade
100mM fosfato-Na pH6,0	50 ml
$\alpha$ -naphthyl acetate	25mg dissolvido em 0,5 ml de acetona
$\beta$ -naphthyl acetate	25mg dissolvido em 0,5ml de acetona
Fast Blue RR salt	50mg

**Tabela 4** – Protocolo utilizado para isoenzima Glutamato Oxaloacetato Transaminase (GOT) (E.C. 2.6.1.1), para 20ml.

Produto	Quantidade
0,2M tris pH 8,0	20ml
Piridoxal-5-fosfato	2mg/ml
Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	30mg
Fast Blue BB salt	30mg/ml
ácido L-aspártico neutralizado*	2ml

\*Para neutralizar o Ácido Aspártico basta acrescentar NaOH e acertar o pH para 8,0.

**Tabela 5** – Protocolo utilizado para isoenzima Malato Desidrogenase (MDH) (E.C. 1.1.1.37), para 50ml.

Produto	Quantidade
50mM tris pH 8,5	50ml
Ácido Málico neutralizado*	150mg/ml
NADP	5mg/ml
PMS	1mg/0,4ml
MTT	7mg/ml

\*Para neutralizar o ácido málico basta acrescentar NaOH e acertar o pH para 8,0.

**Tabela 6** – Protocolo utilizado para isoenzima Glucose-6-fosfato Deshidrogenase (G<sub>6</sub>PD) (E.C 1.1.1.44), para 50ml.

Produto	Quantidade
50mM tris pH 8,5	50ml
MgCl <sub>2</sub>	50mg/ml
Glucose-6-fosfato	50mg
NADP	5mg/ml
PMS	2mg/0,4ml
MTT	10mg/ml

## 7.2 Anexo 2 – Meios de Cultura

### 7.2.1 Meio B-5 (Gamborg et al. 1968) para 1L

Primeiramente pesar os macronutrientes da tabela 7.

**Tabela 7** – Quantidades de macronutrientes pesados para preparo do meio B5.

Macronutrientes	mg.L <sup>-1</sup>
KNO <sub>3</sub>	2500
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	150
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	150

Em seguida, pipetar os micronutrientes da solução estoque de MS VI e da solução de sulfato ferroso (estoque MS V). As vitaminas e substâncias orgânicas são pipetadas de acordo com as tabelas 8 e 9.

**Tabela 8** – Quantidades de vitaminas pipetadas para preparo do meio B5.

Solução Estoque	µL
Tiamina HCl	5.000
Piridoxina HCl	500
Ácido nicotínico	500

Quando a solução estoque for 200mg de vitamina para 100ml de água bidestilada

**Tabela 9** – Quantidades de substâncias orgânicas pesadas para preparo do meio B5.

Substâncias Orgânicas	Concentrações
Myo-inositol	100,0 mg
Sacarose	20,0 g.L <sup>-1</sup>
AGAR	5,8 g.L <sup>-1</sup>

Arrumar o pH para 5,8 e autoclavar por 20 minutos.

### 7.2.2 Meio MS (Murashige & Skoog, 1962) para 1L

Primeiramente pesar os macronutrientes da tabela 10.

**Tabela 10** – Quantidades de macronutrientes pesados para preparo do meio MS.

Macronutrientes	mg.L <sup>-1</sup>
KNO <sub>3</sub>	1900
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170

Em seguida, pipetar os micronutrientes da solução estoque de MS VI e da solução de sulfato ferroso (estoque MS V). As vitaminas e substâncias orgânicas são pipetadas de acordo com as tabelas 11 e 12.

**Tabela 11** – Quantidades de vitaminas pipetadas para preparo do meio MS.

Solução Estoque	$\mu\text{L}$
Tiamina HCl	5.0
Piridoxina HCl	250
Ácido nicotínico	250
Glicina	1000

Quando a solução estoque for 200mg de vitamina para 100ml de água bidestilada

**Tabela 12** – Quantidades de substâncias orgânicas pesadas para preparo do meio MS.

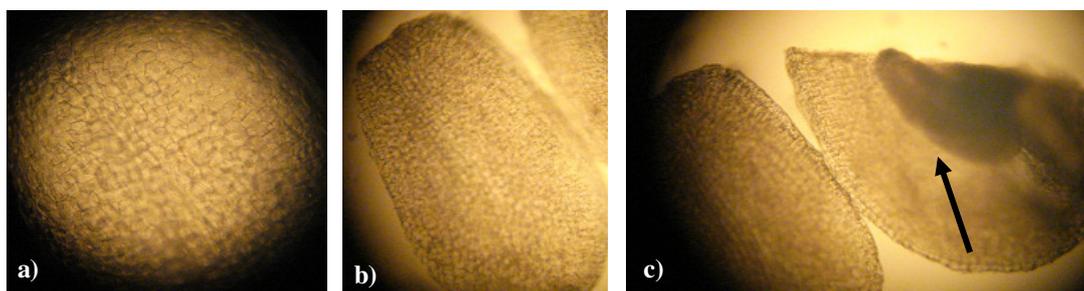
Substâncias Orgânicas	Concentrações
myo-inositol	100,0 mg
Sacarose	30,0 g.L <sup>-1</sup>
AGAR	5,8 g.L <sup>-1</sup>

Arrumar o pH para 5,8 e autoclavar por 20 minutos.

### 7.3 Anexo 3 – Figuras



**Figura 1** - Planta de alho bem desenvolvida com presença de raízes em meio de bulbificação com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose sem a formação de bulbinho.



**Figura 2** - Óvulos de cebola; a) Vista de topo mostrando forma esférica e sem formação de massa embrionária no interior; b) vista lateral mostrando formato alongado e também sem formação de massa embrionária; c) óvulo (direita) em corte transversal com nítida formação interna de massa celular ou embrião (seta).

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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