

**FRANCISCO AUGUSTO ALVES CÂMARA**

**OBTENÇÃO DE PLANTAS DE ALHO ( *Allium sativum* L.) A  
PARTIR DE MERISTEMAS E MICROBULBIFICAÇÃO**

*in vitro*

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia para obtenção do grau de "MESTRE"

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS

1988

cat T 635.26  
CAM  
068

FRANCISCO AUGUSTO BLYES CÂMARA

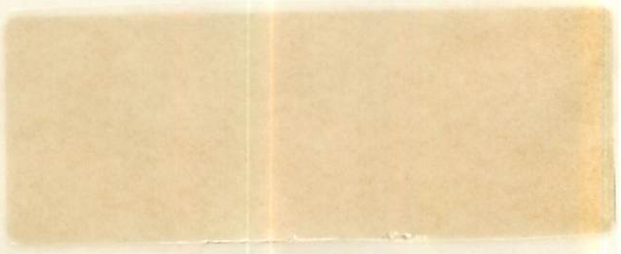
DETERMINAÇÃO DE PLANTAS DE ALHO (Allium sativum L.) A PARTIR DE MERISTEMAS E MICROBULBIFICAÇÃO

em alho

Disciplina apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, Minas Gerais, em extensão do Curso de Medicina em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia para obtenção do grau de

MESTRE

[REDACTED]



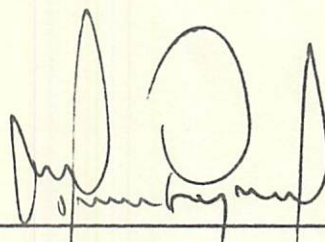
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS

1988

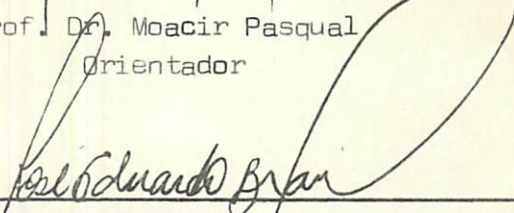
OBTENÇÃO DE PLANTAS DE ALHO (*Allium sativum* L.) A PARTIR DE  
MERISTEMAS E MICROBULBIFICAÇÃO *in vitro*

APROVADA:



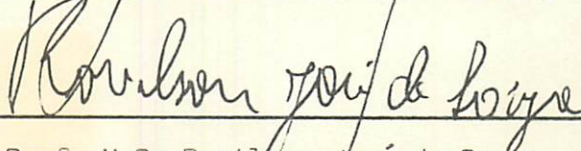
---

Prof. Dr. Moacir Pasqual  
Orientador



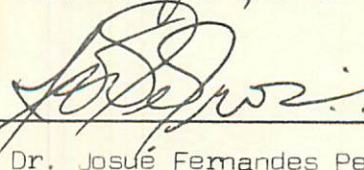
---

Prof. Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto



---

Prof. M.S. Rovilson José de Souza



---

Prof. Dr. Josué Fernandes Pedrosa

A memória de meu pai,

Péricles

HOMENAGEM

À minha mãe Teresinha,  
a meus irmãos Tereza e Júnior,  
a meus cunhados Hudson e Jaqueline,  
a meus sobrinhos Fábio, Flávia e  
Fernando,  
pelo incentivo, carinho e esperança,

DEDICO

## BIOGRAFIA DO AUTOR

FRANCISCO AUGUSTO ALVES CÂMARA, filho de Péricles Augusto Câmara e Teresinha Alves Câmara, nasceu em Mossoró, Estado do Rio Grande do Norte, a 22 de agosto de 1959.

Em agosto de 1978, iniciou o curso de Engenharia Agrônômica, na Escola Superior de Agricultura de Mossoró - ESAM, concluindo-o em julho de 1982.

Em junho de 1983, foi admitido pela Escola Superior de Agricultura de Mossoró, para exercer as funções de Engenheiro Agrônomo, junto a Coordenadoria das Unidades de Produção.

Foi designado para fazer o Curso de Pós-Graduação a nível de mestrado em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, na Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, Lavras - MG, em março de 1986, e defendeu tese em 19 de dezembro de 1988.

## AGRADECIMENTOS

As seguintes Instituições, pela oportunidade do curso e facilidades no desenvolvimento do trabalho de tese:

- . Escola Superior de Agricultura de Mossoró (ESAM)
- . Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- . Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL)
- . Laboratório de Cultura de Tecidos da ESAL
- . Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FAEPE)
- . Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- . Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)

À amizade, incentivo, apoio e colaboração de:

- . Dr. Moacir Pasqual
- . Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
- . M.S. Rovilson José de Souza
- . Dr. Josué Fernandes Pedrosa
- . M.S. Gilberto de Souza Pires
- . M.S. Pedro Fernandes Pereira
- . M.S. Elaine Maria Resende Pereira

- . Cont. Alvanete Freire Pereira
- . M.S. Márcio José Furtado
- . M.S. Raimundo Nonato Bravo Alves
- . Eng. Flo. Dulcinéia de Carvalho
- . Eng. Agrº Paulo Henrique Pereira Peixoto
- . Eng. Agrº Fernando de Lellis Garcia Bertolucci
- . Eng. Agrº Hilda de Souza Bruzi
- . Eng. Agrº Marcio de Castro Silva Filho
- . Biol. Maria Helena de Freitas
- . Biol. Ramon Gimenez
- . Bib. Maria Helena de Castro
- . Ac. Grad. Fabiano Vieira Tito
- . Lab. Evaldo de Souza Arantes
- . Lab. Vantuil Antonio Rodrigues
- . Sr. José Moraes de Lima e família.

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

## LISTA DE QUADROS

Quadro		Página
1	Percentagem média de bulbilhos germinados, de sete cultivares de alho ( <i>Allium sativum</i> L.), sob dois meios de umedecimento. ESAL, Lavras-MG, 1988. ....	18
2	Percentagem média de bulbilhos germinados, de sete cultivares de alho ( <i>Allium sativum</i> L.), sob dois substratos. ESAL, Lavras-MG, 1988. ....	19
3	Resultados médios da altura de mericlones de sete cultivares de alho ( <i>Allium sativum</i> L.) sob diferentes concentrações de BAP e ANA, aos 30 dias de idade. ESAL, Lavras-MG, 1988. ....	22
4	Número médio de folhas de mericlones de alho ( <i>Allium sativum</i> L.) cultivares, Amarante, Branco Mossoró, Cateto Roxo, Chinês e Juréia, sob diferentes concentrações de BAP. ESAL, Lavras-MG, 1988. ....	25
5	Número médio de folhas de mericlones de alho ( <i>Allium sativum</i> L.) cultivares: Amarante, Branco Mossoró, Cateto Roxo, Chinês e Juréia, sob diferentes concentrações de ANA. ESAL, Lavras-MG, 1988. ....	26



## Quadro

## Página

6	Número médio de folhas de mericlones de alho ( <i>Allium sativum</i> L.) cultivares Chonan e Gigante Roxo, sob diferentes concentrações de BAP e ANA. ESAL, Lavras-MG, 1988. ....	27
7	Diâmetro e peso médio de microbulbos, obtidos <i>in vitro</i> de alho ( <i>Allium sativum</i> L.) da cultivar Gigante Roxo, sob diferentes níveis de sacarose. ESAL, Lavras-MG, 1988. ....	28
8	Diâmetro e peso médio de microbulbos, obtidos <i>in vitro</i> de alho ( <i>Allium sativum</i> L.) da cultivar Gigante Roxo, sob diferentes níveis de nitrogênio. ESAL, Lavras-MG, 1988. ....	30
9	Diâmetro e peso médio de microbulbos, obtidos <i>in vitro</i> de alho ( <i>Allium sativum</i> L.) da cultivar Gigante Roxo, sob diferentes níveis de nitrogênio e sacarose. ESAL, Lavras-MG, 1988.	31
10	Número médio de microbulbos germinados, submetidos a diferentes tratamentos de pré-germinação, aos 32 dias de idade. ESAL, Lavras-MG, 1988. ....	35

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Meristema de alho acompanhado de um primórdio foliar (0,5 mm), usado para início da cultura .....	13
2	Desenvolvimento comparativo de mericlones das diferentes cultivares de alho, em meio básico 'MS', na ausência de reguladores de crescimento, 30 dias após o início da cultura .....	28
3	Microbulbos de alho, cultivar Gigante Roxo, obtidos in vitro, sob diferentes concentrações de nitrogênio e sacarose .....	32
4	Comparação de mericlones em que o nitrogênio foi omitido (esquerda) e mantido (direita) .....	34
5	Equações de regressão para cada tratamento de quebra de dormência de microbulbos de alho ( <i>Allium sativum</i> L.) cv. Gigante Roxo, em quatro épocas de avaliação. ESAL, Lavras-MG, 1988 .....	37

## ABREVIACÕES

A caracterização do meio de cultura e as diversas substâncias que compõem o meio são referidas no decorrer do trabalho através de abreviaturas cujo significado é dado a seguir:

AIA	=	cido indole-3-acético
BAP	=	6-Benzilaminopurina
2iP	=	2-isopenteniladenina
GA <sub>3</sub>	=	ácido giberélico
HCl	=	cido clorídrico
'MS'	=	Murashige & Skoog
ANA	=	cido naftaleno acético
NaOCl	=	Hipoclorito de sódio
NaOH	=	Hidróxido de sódio
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	=	Amnia
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	=	Nitrato
Tween 20	=	Polyoxyethyleno sorbitan monolanato

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
3.1. Local .....	10
3.2. Cultivares .....	10
3.3. Experimentos .....	11
3.3.1. Germinação in vitro de bulbilhos de alho .....	11
3.3.2. Cultura de Meristemas de cultivares de alho .....	12
3.3.3. Bulbificação in vitro da cultivar de alho Gigante Ro- xo .....	14
3.3.4. Germinação de microbulbos obtidos in vitro da culti - var de alho Gigante Roxo .....	15
3.4. Análise Estatística .....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
4.1. Germinação in vitro de bulbilhos de alho .....	17
4.2. Cultura de Meristemas de cultivares de alho .....	20
4.2.1. Altura dos mericlones .....	21
4.2.2. Número de folhas .....	24
4.3. Bulbificação in vitro da cultivar de alho Gigante Roxo .....	29

4.4. Germinação de microbulbos obtidos in vitro da cultivar de alho Gigante Roxo .....	35
5. CONCLUSÕES .....	38
6. RESUMO .....	40
7. SUMMARY .....	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
APÊNDICE .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do alho (*Allium sativum* L.) tem, no Brasil, elevada importância econômica, por ser juntamente com a cebola (*Allium cepa* L.) e outras, um produto condimentar de larga utilização popular, apresentando também uma grande aceitação como medicamento, principalmente por suas propriedades antibacterianas. Pode ser classificado como alimento energético por possuir menos de 20% de proteínas e menos de 18% de fibra bruta, de acordo com SATURNINO (36).

Seu cultivo no Brasil, data dos tempos coloniais. Atualmente ocupa o quarto lugar entre as espécies olerícolas mais cultivadas, porém, apresenta ainda produtividade relativamente baixa. Com isto, a produção brasileira é insuficiente para atender a demanda interna, acarretando vultuosa perda de divisas, com a importação do produto.

Dentre os vários fatores que contribuem para esta baixa produtividade, estão as doenças fúngicas e principalmente as viróticas (08, 09, 32, 40) pois trata-se de uma espécie apomítica obrigatória a qual facilita a perpetuação de moléstias, e conseqüentemente, a possível distribuição de patógenos no material vegetal.

De acordo com NOVÁK (30), na obtenção de bulbilhos sadios de alho, dois métodos têm sido empregados, isoladamente ou em combinação, a terapia e a cultura de meristemas.

A multiplicação do material sadio é possível paralelamente a eradicação do vírus, a qual acelera todo o processo. Normalmente as regenerantes desenvolvidas são transferidas para o solo, após o enraizamento, porém, com razoável sucesso, devido a fase crítica de aclimação, onde as perdas de material são consideráveis, NOVÁK (27).

Uma metodologia adaptada para a obtenção de clones de alho livres de doenças, é o primeiro passo para a determinação dos prejuízos da doença, pois este processo no Brasil é ainda bastante limitado. Posteriormente, pode-se implantar um programa visando a multiplicação segura desse material para substituição do alho infectado. O presente trabalho tem como objetivos:

- a) determinar um substrato apropriado a germinação *in vitro*
- b) desenvolver um meio de cultura que propicie um rápido e vigoroso desenvolvimento dos meristemas *in vitro*
- c) determinar condições adequadas à bulbificação *in vitro*
- d) determinar condições adequadas a quebra de dormência dos microbulbos obtidos *in vitro*.

*objetivos*

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O alho (*Allium sativum* L.) é uma espécie olerícola cultivada desde tempos remotos e, acredita-se que seja originada de zonas temperadas do continente euro-asiático, e mais precisamente da Silícia ou Ásia Ocidental (07, 10, 37). Encontra-se atualmente cultivada em quase todas as regiões do mundo, DEPOUDIS et alii (10).

A planta é herbácea, alcançando 50-60 cm de altura, suas folhas cerosas são lanceoladas, com secção em forma de V, FILGUEIRA (13). O bulbo é arredondado, ligeiramente periforme, e constituído de vários bulbilhos, de forma ovóide arqueada, cobertos por duas folhas protetoras, quase transparentes, de cor branca ou arroxeada. Os agrupamentos de bulbilhos são ligados ao caule pela base, e envolvidos por várias folhas chamadas de túnicas, que são delgadas, de cor clara ou ligeiramente coloridas de roxo, SHIMOYA (37). As raízes são fasciculadas, pouco ramificadas, com crescimento vertical, FILGUEIRA (13).

Dentre as hortaliças, o alho ocupa o quarto lugar em importância econômica para o Brasil, com um rendimento médio de 4.221 kg por hectare, segundo os dados do IBGE 1986 (02).

No Brasil (08, 09, 32), como em outras regiões do mundo (04, 05, 23, 25, 41), a virose causadora do estriado amarelo do alho (Garlic Yellow



Stripe Virus) infecta, provavelmente, todas as cultivares comercialmente utilizadas, e pode causar uma redução na produtividade da ordem de 6 a 35%, dependendo da tolerância da cultivar.

Aumento de produtividade das cultivares brasileiras de alho pode ser conseguido livrando-as dos vírus que as infectam, CARVALHO (08). Dos processos utilizados na erradicação de viroses, a cultura de meristemas, incluindo o meristema propriamente dito acompanhado de 2 primórdios foliares, tem se mostrado altamente eficiente. Como os meristemas mantêm alta estabilidade genética, podem, conseqüentemente, ser usados para conservação de germoplasma *in vitro*. Esta técnica tem sido estudada mais extensivamente para o alho, quando comparada com a cultura da cebola, NOVÁK (30).

Hollings, citado por RESENDE (35), observou que o termo "cultura de meristema" estava sendo aplicado indiscriminadamente para porções de tecidos, a partir de 0,1 a 10 mm de tamanho. Sugeriu então que o termo meristema seria o conjunto de células, formado pela túnica e corpus acompanhado do primeiro par de primórdios foliares, sendo este o tecido unitário mais usado para o cultivo *in vitro*. DANIELS (09), verificou que o tamanho dos meristemas influencia na obtenção de plantas livres de vírus e o desenvolvimento das mesmas, é melhorado a partir do momento em que o tecido meristemático é acompanhado de 1 ou 2 primórdios foliares. Ápices entre 0,2 e 0,5 mm têm apresentado melhores chances de produzirem plântulas livres de vírus, QUAK (33), o que também foi confirmado por BHOJWANI et alii (05), trabalhando com dois clones melhorados de alho e por NOME & SALVADORES (26) e FRISON & NG (15), na obtenção de plantas de batata doce livres de vírus. MOSELLA CH. & FERNANDES M. (23), utilizaram meristemas com tamanho variando de 0,6 a 1,0 mm com sucesso, obtendo todas as plantas cultivadas livres de *Fusarium* e nematóides. O uso de meristemas com 1 ou 2 primórdios foliares também foi relatado por NOME et alii (25), os quais obtiveram aproximadamente 87% de plantas livres de vírus, resultados similares aos obtidos por WALKEY et alii (41), os quais combinaram a cultura de meristemas com a termoterapia. Segundo RESENDE (35), meristemas menores

que 0,1 mm são rejeitados, pela dificuldade de desenvolvimento *in vitro* e aqueles maiores que 0,5 mm, podem estar infectados por vírus

// A fonte de explante é muito importante para o sucesso da regeneração de plântulas de alho. Bulbilhos maduros, em estado de dormência, podem ser usados (04, 05, 09, 25), porém sem muito sucesso devido a dificuldade, DANIELS (09).

O mesmo autor (09), usou o tratamento de pré-germinação em câmara fria à temperatura de  $\pm 12^{\circ}\text{C}$  por um período de 30 dias. Posteriormente, foram colocados para germinar em vermiculita em câmara de crescimento à temperatura de 25 e  $33^{\circ}\text{C}$ , noturna e diurna, respectivamente, sob um fotoperíodo de 14 horas, a uma intensidade luminosa de 7.000 lux. Solução nutritiva de Hoagland foi utilizada por DOLEZEL et alii (11) como substrato para germinação de bulbilhos, na ausência de luz, a uma temperatura de  $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , até que as raízes das plantas alcançassem um tamanho superior a 20 mm. Plantas estabelecidas no campo, com uma altura de 10-20 cm, apresentando 3-4 folhas, foram usadas com mais facilidade na extração de meristemas, em estudos realizados por MOSELLA CH. & FERNANDEZ M. (23) e NOVÁK (28).

\* A assepsia da superfície do explante, de uma maneira geral, encontra-se bem definida. Alternativas podem ser executadas, tais como: a simples imersão rápida dos bulbilhos em etanol 94% seguida de flambagem, como usado por BHOJWANI (04, 05); em etanol 70% por um período de 30 minutos, NOVÁK (28); hipoclorito de sódio 0,9% por 15 minutos, ABO EL-NIL (01) e clorox 5,25% diluída 1:5 v/v, KEHR (21).

Também pode-se usar alternativas combinadas: etanol 70 ou 94% por 5 segundos e imersão em solução de hipoclorito de sódio 5% por 5 minutos, HAVRÁNEK (17); cloramina B por 30 minutos, NOVÁK (30) ou hipoclorito de cálcio 5% por 20 minutos (23, 25, 33). Todas estas alternativas são seguidas por lavagens em água destilada e autoclavada por 3 a 5 vezes.

O meio de cultura constitui o principal fator na regeneração de

uma planta completa *in vitro*, com raízes e parte aérea normais, desenvolvidas a partir de tecido meristemático, RESENDE (35). Um meio básico mais geral é o desenvolvido por MURASHIGE & SKOOG (24). Entre outros meios de cultura, este é caracterizado por altas concentrações de íons de potássio, amônia e mioinositol, QUAK (33). O ferro é aplicado na forma de complexo de quelato, e parece ser a melhor, MURASHIGE & SKOOG (24).

Segundo GEORGE & SHERRINGTON (16), o requerimento de energia é normalmente suprido pela sacarose (2-3% peso/volume), dependendo da espécie em estudo, embora algumas vezes possa ser substituída por glucose. A tiamina é a vitamina mais frequente, seguida pelo ácido nicotínico e piridoxina. O inositol, que é um álcool-açúcar, tem frequentemente auxiliado no crescimento e diferenciação de vários tecidos.

Geralmente a cultura de meristemas é feita usando 0,6 a 0,8% de agar como suporte. Em algumas espécies de plantas o crescimento de raízes pode ser dificultado em meio sólido; para tais casos pode ser preferível o meio líquido com papel filtro usado como suporte. Pennazio & Redolfi, citados por QUAK (33), observaram que plântulas de batata cultivadas no meio líquido foram mais vigorosas e apresentaram melhor desenvolvimento do sistema radicular do que aquelas cultivadas no meio sólido. DEROMEDIS (10), estudando as condições de meio de cultivo mais aconselhadas na obtenção de um maior número de flores por inflorescência de alho, observou que o cultivo de escapos em meio líquido é mais fácil, rápido e econômico, quando comparado ao meio sólido.

O pH do meio pode ser um fator limitante para o crescimento, e no geral, segundo QUAK (33), a faixa ideal situa-se entre 5,5 a 5,8 para o meio sólido e de 5,0 a 6,0 para o meio líquido, dependendo da espécie; segundo GEORGE & SHERRINGTON (16).

É necessário que o meio de cultura contenha reguladores de crescimento, substâncias responsáveis pela regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal, RESENDE (35). Em estudos realizados por BHOJWANI (04), o índi-

ce de multiplicação da planta de alho foi afetado pela presença de 2iP e ANA (0,508 e 0,09 mg L<sup>-1</sup>), respectivamente, o mesmo acontecendo com WALKEY et alii (41), quando estudaram uma combinação ótima de auxina/citocinina, conseguindo um índice máximo quando combinaram 4 ou 8 mg L<sup>-1</sup> de AIA e 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Segundo NOVÁK et alii (30, 31), o BAP induz a múltipla formação de brotos na cultura de meristemas. Bons resultados foram obtidos pelos autores, na cultura de meristemas usando uma combinação de 0,186 mg L<sup>-1</sup> de ANA com 0,225 ou 1,126 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Doses superiores a 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, de acordo com MOSELLA CH. & FERNANDEZ (23) causam uma deformação das plântulas.

DANIELS (09), usando dois métodos na cultura de meristemas, o de Wang & Huang (1974), inicialmente usando um terço das concentrações dos componentes do meio de cultura na ausência de reguladores de crescimento e seguido de transferência após um mês para um novo meio com a adição de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA e o método de Quiot et alii (1972), que possui macro e micronutrientes nas concentrações correspondentes às do meio 'MS', respectivamente, cem e mil vezes maiores com adição de ANA a 0,1 mg L<sup>-1</sup>, observou que não houve interferência nas percentagens de plântulas obtidas quanto ao método utilizado, porém, as plântulas transferidas para areia, primeiro método, produziram bulbos maiores do que as plântulas que permaneceram nos frascos, segundo método.

MOSELLA CH. & FERNANDES M. (23), observaram que 80% das plantas enraizadas, na presença de ANA, em curto período de tempo começaram a formar tecidos de reserva. ILLG & SIQUEIRA (20), usando meio de cultura sem a presença de reguladores de crescimento, conseguiram resultados satisfatórios elevando o fotoperíodo de 12 para 16 horas de luz, observação também feita por BHONJWANI (04).

A presença do nitrogênio na forma amoniacal, levando a uma baixa taxa de nitrificação, com provável toxidez de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no início do crescimento, e disponibilidade elevada de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em uma fase crítica, tem prejudicado a bulbificação de alho com uma formação de pseudoperfilhamento no final do ciclo da cultura, segundo observações feitas por MAGALHÃES (22).

As condições ambientais também são importantes para o sucesso do cultivo *in vitro* de meristemas. HUSSEY (18), estudando o efeito da temperatura no desenvolvimento das plântulas, encontrou que para a cebola, o crescimento é mais rápido à temperatura de 25°C, porém as folhas apresentaram uma coloração verde menos intenso do que aquelas cultivadas à temperaturas de 20 e 15°C. Um maior número de brotos de cebola, foram formados quando o fotoperíodo foi aumentado de 8 para 16 horas, HUSSEY & FALAVIGNA (19).

Tanto no campo, como *in vitro*, o período de colheita dos bulbos ou microbulbos, respectivamente, muda naturalmente de uma variedade para outra. De modo geral, o sinal de amadurecimento é detectado logo que a ponta das folhas vai ficando amarela. Aos poucos esta coloração se espalha em direção à base da planta (05, 07, 09, 13, 20, 23, 25, 41, 42).

Microbulbos, após a colheita, devem ser lavados, para a remoção de restos de meios de cultura, secados e curados, ILLG & SIQUEIRA (20).

Segundo ARGUELLO et alii (03), o período de dormência do alho 'Rosado Paraguaio' é caracterizado pela ausência de atividade das giberelinas e uma moderada atividade dos inibidores, por um período de até setenta dias após a colheita. Uma alta atividade de giberelina vinte dias após o início do crescimento da folha de brotação, é acompanhada pelo decréscimo na concentração de inibidores de crescimento. As substâncias inibidoras são solúveis em água e por essa razão a exposição do bulbilho a um fluxo de água corrente pode levá-lo a perder a condição de dormência, favorecendo o balanço hormonal promotor/inibidor, FERREIRA et alii (12) e NOME et alii (25). A aplicação de baixas temperaturas aos bulbilhos estimula modificações no balanço hormonal, levando o bulbilho à brotação, BURBA (06). Observações similares foram efetuadas por NOME et alii (25), trabalhando com a cultivar Chileno submetida a temperaturas de 4°C por um período de 15 dias.

A multiplicação de material a partir de microbulbos proporcionaria uma maior segurança, com menores perdas na fase crítica de aclimação, do

que plântulas obtidas *in vitro*, que apresentam maior sensibilidade e menor vigor na adaptação ao ambiente externo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local

Os experimentos foram conduzidos durante o período de 1986 a 1988, no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, MG.

#### 3.2. Cultivares

Nos testes de "Germinação *in vitro* de bulbilhos de alho" e "Cultura de Meristemas", foram utilizadas sete cultivares de alho (*Allium sativum* L.): 'Cateto Roxo' e 'Juréia' (ciclo precoce); 'Amarante' e 'Gigante Roxo' (ciclo médio); 'Chinês' e 'Chonan' (ciclo tardio) provenientes da Estação Experimental da EPAMIG de Lavras - MG e a 'Branco Mossoró' (ciclo precoce) do Departamento de Fitotecnia da Escola Superior de Agricultura de Mossoró - ESAM - RN. Para os testes de "Bulbificação *in vitro*" e "Germinação de microbulbos obtidos *in vitro*" foi utilizada apenas a cultivar Gigante Roxo.





### 3.3. Experimentos

Realizou-se um total de quatro experimentos que descreve-se na mesma ordem de execução.

#### 3.3.1. Germinação *in vitro* de bulbilhos de alho

Os bulbos das sete cultivares foram submetidos a uma seleção individual, com o objetivo de serem escolhidos aqueles melhores no aspecto fitossanitário. As folhas que envolvem o conjunto de bulbilhos (túnicas), foram removidas e mais uma vez foi realizada uma nova seleção, desta vez, para os bulbilhos.

Dos bulbilhos selecionados, foram retiradas as folhas protetoras do tecido de armazenamento e colocados em água corrente por um período de três horas. Posteriormente, mergulhados em 30% de solução comercial com 0,2% de NaOCl, adicionada de duas gotas do espalhante adesivo, Tween 20, para 100mL de solução, por um período de 20 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, os bulbilhos foram lavados três vezes em água destilada autoclavada e inoculados em diferentes substratos previamente preparados.

Os substratos utilizados foram: algodão hidrófilo e vermiculita, umedecidos com sais minerais do meio 'MS' e água destilada, ambos com pH ajustado para  $5.7 \pm 0.1$ , utilizando-se NaOH e/ou HCl, totalizando quatro tratamentos. Após a preparação, 20 mL de meio foi colocado em frascos "cister vidro pote tipo azeitona 200 mL", já contendo aproximadamente 80 cm<sup>3</sup> de vermiculita ou uma camada de algodão, de altura aproximada ao outro substrato, fechados com tampa plástica e autoclavados por 20 minutos a 120°C e 1,3 kg cm<sup>-2</sup>.

Foram inoculados dez bulbilhos por frasco, com seis repetições por tratamento, para cada cultivar. Após a inoculação, os recipientes contendo os bulbilhos, foram incubados em sala de crescimento a temperatura de  $26^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , na ausência de luz.

O efeito dos tratamentos foi avaliado quatro dias após a inoculação, por três dias consecutivos, tomando-se a percentagem de bulbilhos germinados.

### 3.3.2. Cultura de Meristemas de cultivares de alho

Utilizando-se o substrato algodão hidrófilo umedecidos com água destilada, bulbilhos selecionados e assépticos foram colocados para germinar *in vitro*, na ausência de luz. Para cada cultivar, o processo de germinação foi conduzido escalonadamente, com o objetivo de se obter de forma constante, plântulas de 4 dias de idade, aptas para extrair o ápice meristemático.

Em câmara de fluxo laminar, os bulbilhos foram colocados sobre placas de Petri, onde cortou-se as raízes e a parte aérea com a ajuda de pinças e bisturis cirúrgicos. Em seguida, mergulhados por 5 segundos em álcool 94% e flambados rapidamente. Posteriormente, a folha de reserva foi removida, e o material vegetal (folha de brotação e folhas completas), que consiste em 2 a 3 cm de tamanho da seção basal das plântulas, passou por nova assepsia, onde foi utilizado 30% de solução comercial 0,2% de NaOCl, adicionada de 2 gotas do espalhante adesivo, Tween 20, para 100 mL de solução, por 20 minutos. Após este período, foram lavados por 3 vezes em água destilada autoclavada, para a remoção do desinfestante. Posteriormente, foi realizada a operação de remoção dos ápices meristemáticos sobre uma placa de Petri, contendo papel filtro umedecido com água destilada, sob um microscópio estereoscópico com aumento de até 40 vezes, utilizando-se uma pinça de ponta fina, bisturis cirúrgicos e es-

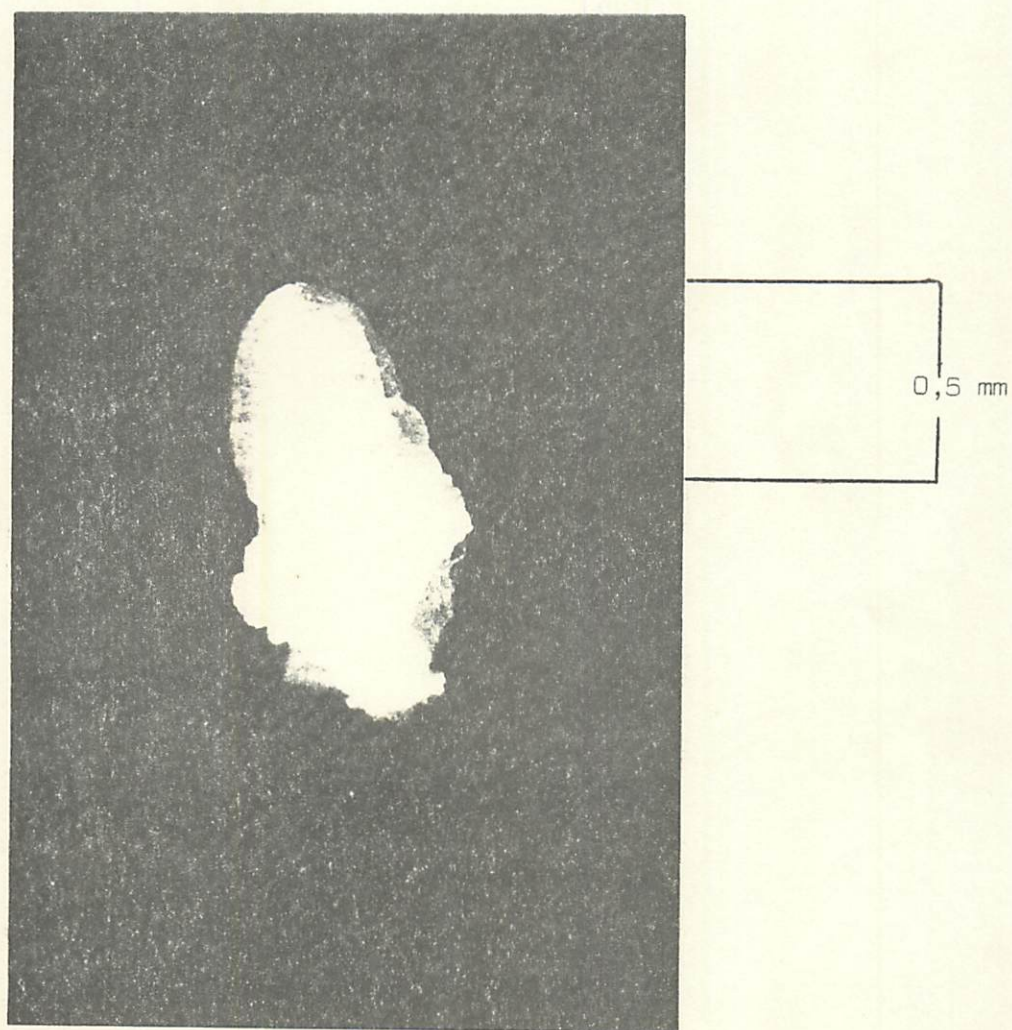


FIGURA 1 - Meristema de alho acompanhado de um primórdio foliar (0,5 mm), usado para início da cultura.

tiletos. As bases das folhas foram removidas cuidadosamente, até atingir o ápice meristemático, com 1 primórdio foliar, de aproximadamente 0,5 mm de tamanho, Figura.1. Após a remoção, foram rapidamente inoculados em tubos de ensaio (2,5 x 15 cm) contendo 15 mL de meio de cultura, e incubados em sala de crescimento com temperatura de  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$  em 16 horas de fotoperíodo, sob luz branca fria, com intensidade luminosa de 3.000 lux.

Utilizou-se o meio básico de cultura contendo sais minerais do meio 'MS' adicionado de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de tiamina HCl, ácido nicotínico e piridoxina HCl,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol,  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de glicina,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e em todas as combinações possíveis dos reguladores de crescimento ANA e BAP nas concentrações de 0,00; 0,05; 0,50 e  $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ , totalizando 16 tratamentos com 4 repetições, para cada cultivar. O meio foi ajustado para  $\text{pH } 5.7 \pm 0.1$ , solidificado com 0,8% de agar.

Todo o material utilizado, durante a operação de remoção do ápice meristemático, foi previamente autoclavado a  $120^{\circ}\text{C}$  e  $1,3 \text{ kg cm}^{-2}$  por 20 minutos.

O efeito dos tratamentos foi avaliado 30 dias após a inoculação, tomando-se a altura dos mericlones, determinações estas feitas com régua milimetrada, medindo-se a partir da base até o ponto máximo da primeira folha emitida; a contagem do número de folhas e observações visuais sobre a formação de calos na base dos mericlones.

### 3.3.3. Bulbificação in vitro da cultivar de alho Gigante Roxo

Ápices meristemáticos, com 1 primórdio foliar, de aproximadamente 0,5 mm de tamanho da cultivar Gigante Roxo, após a germinação in vitro, foram inoculados em tubos de ensaio (2,5 x 15 cm) com 15 mL de meio básico de cultura contendo sais minerais do meio 'MS' adicionado de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de tiami-

na HCl, ácido nicotínico e piridoxina HCl, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 2 mg L<sup>-1</sup> de glicina, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,05 mg L<sup>-1</sup> dos reguladores de crescimento BAP e ANA. O meio foi ajustado para pH 5.7 ± 0.1, solidificado com 0,6% de agar e incubados por um período de 30 dias em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 1°C em 16 horas de fotoperíodo, sob luz branca fria, com intensidade luminosa de 3.000 lux.

Após 30 dias, os mericlones obtidos foram então transferidos para tubos de ensaio (2,5 x 20 cm), contendo 20 mL de meio de cultura líquido, sobre um suporte de papel filtro.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado. Utilizou-se para constituir os 12 tratamentos, 4 (quatro) concentrações de nitrogênio, em µM, (60, 30, 15 e 0) e 3 (três) de sacarose em g L<sup>-1</sup>, (30, 60 e 120).

Após a transferência, os tubos contendo os mericlones, foram incubados em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 1°C em 16 horas de fotoperíodo, sob luz branca fria, com intensidade luminosa de 3.000 lux.

Observações visuais foram realizadas semanalmente e na quarta semana, após a transferência, o efeito dos tratamentos foi avaliado tomando-se o diâmetro em mm e o peso em gramas dos microbulbos obtidos. As determinações foram feitas com auxílio de paquímetro e balança de precisão, respectivamente.

Os microbulbos obtidos foram lavados e acondicionados em placas de Petri, à temperatura ambiente, por um período de trinta dias.

### 3.3.4. Germinação de microbulbos obtidos *in vitro* da cultivar de alho Gigante Roxo

Os microbulbos, da cultivar Gigante Roxo, obtidos no Experimento

3, após um período de 30 dias de repouso à temperatura ambiente do Laboratório, foram misturados e divididos, ao acaso, em 6 placas de Petri, contendo 17 microbulbos cada, as quais constituíram os tratamentos deste experimento.

Antes da realização do plantio, foram aplicados os seguintes tratamentos de pré-germinação para cada grupo de microbulbos, anteriormente separados: frigorificação à 5°C por períodos de 10 e 5 dias; lavagem em água corrente por período de 2 horas; imersão em 100 mL de solução de GA<sub>3</sub> (20 mg L<sup>-1</sup>) por períodos de 4 e 2 horas e a testemunha.

O plantio foi realizado em bandejas de isopor (speedlings) contendo 128 células de formato piramidal, vazadas em baixo de forma a permitir a drenagem. Cada célula, com dimensões de 3,5 x 3,5 cm de boca, 1 x 1 cm de fundo e 12 cm de altura, comportando cerca de 80 mL de substrato.

Foi utilizado um substrato composto de solo, vermiculita, casca de Pinus e areia, esterelizados em estufa a 80°C por um período de 24 horas.

Foram feitas irrigações semanais com solução completa de Hoagland, diluída de 1:10 (v/v) e irrigações diárias, com água destilada, de forma a fornecer nível adequado de umidade às plantas.

A percentagem de germinação dos microbulbos foi avaliada por quatro semanas consecutivas.

### 3.4. Análise Estatística

As análises foram feitas de acordo com o modelo matemático apropriado para o delineamento inteiramente casualizado. Aplicou-se o teste Tukey a 5% para comparação das médias.

Os dados referentes a percentagem de bulbilhos germinados foram transformados para  $\log(x/100 + 3)$ , os do número de folhas para  $\sqrt{x}$  e os do número de microbulbos germinados para  $\sqrt{x + 1}$ .

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1. Germinação in vitro de bulbilhos de alho

Observa-se no Quadro 1 que, para o tipo de meio de umedecimento usado, houve diferença apenas na cultivar Juréia, onde o uso de água destilada apresentou melhores resultados do que quando os sais do meio 'MS' foram usados. Para as outras seis cultivares, os dados apresentaram resultados similares, não ocorrendo diferença quanto ao tipo de meio de umedecimento usado.

QUADRO 1 - Percentagem média de bulbilhos germinados, de sete cultivares de alho (*Allium sativum* L.), sob dois meios de umedecimento. ESAL, Lavras - MG, 1988. <sup>1/</sup>

Cultivares	Meios de Umedecimento	
	Água destilada	Sais do 'MS'
Amarante	94,2 A	99,2 A
Branco Mossoró	100,0 A	98,3 A
Cateto Roxo	100,0 A	100,0 A
Chinês	100,0 A	100,0 A
Chonan	82,0 A	73,3 A
Gigante Roxo	67,5 A	68,3 A
Juréia	98,3 A	92,5 B

<sup>1/</sup> Médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste F de Snedecor a 5%.

Quanto ao tipo de substrato usado, Quadro 2, foi observado significância para as cultivares Chonan, Gigante Roxo e Juréia, nas quais o uso de algodão hidrófilo, como substrato, apresentou resultados superiores ao substrato vermiculita. Para as outras quatro cultivares, os dados apresentaram resultados similares, não ocorrendo significância pelo teste de F de Snedecor a 5%.

Dentro da câmara de fluxo laminar, a manipulação de plântulas germinadas no substrato algodão hidrófilo é bem mais fácil e rápida do que aquelas germinadas no substrato vermiculita. Isto se deve ao fato de que as raízes das plântulas permanecem sobre a camada de algodão, enquanto que na vermiculita as raízes penetram no substrato e partículas desta ficam aderidas, dificultando assim manipulações.



Algumas contaminações por fungos foram observadas nas plântulas germinadas no substrato vermiculita, o que não ocorreu com o algodão hidrófilo, não chegando a prejudicar o processo de germinação. A vermiculita, provavelmente necessitaria um tempo maior de autoclavagem para uma completa desinfestação.

QUADRO 2 - Percentagem média de bulbilhos germinados, de sete cultivares de alho (*Allium sativum* L.), sob dois substratos. ESAL, Lavras - MG, 1988. <sup>1/</sup>

Cultivares	Substratos	
	Algodão hidrófilo	Vermiculita
Amarante	98,3 A	95,0 A
Branco Mossoró	100,0 A	98,3 A
Cateto Roxo	100,0 A	100,0 A
Chinês	100,0 A	100,0 A
Chonan	90,0 A	65,0 A
Gigante Roxo	75,8 A	60,0 B
Juréia	98,3 A	92,5 B

<sup>1/</sup> Médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de F de Snedecor a 5%.

Um fator que mostrou ser fundamental no processo de germinação foi a ausência de luz, confirmando resultados de DOLEZEL et alii (11), e obtendo-se plântulas germinadas a partir do segundo dia da inoculação e aptas para serem usadas como fonte de material doador de tecido meristemático a partir do quarto dia, período este bem menor do que o usado por DANIELS (09).

Nesta idade, as plântulas apresentaram de 2 a 3 folhas estiola - das, aclorofiladas e podem ser usadas com mais facilidade na operação de remoção do tecido meristemático do que as usadas por MOSELLA CH. & FERNANDEZ M. (23) e NOVÁK (28), pois os tecidos, devido a ausência de luz, encontram-se mais flácidos, facilitando a operação.

Entretanto, o vigor das plântulas, de um modo geral, seguiu uma ordem decrescente, apresentando melhores resultados nas cultivares de ciclo tardio (Chinês e Chonan) e diminuindo até chegar as de ciclo precoce (Branco Mossoró, Cateto Roxo e Juréia), confirmando assim, observações feitas por SHIMOYA (37).

O uso de uma fonte de umedecimento rica em sais minerais é dispensável pois, segundo observações feitas por SHIMOYA (37), as plântulas dependem do tecido de armazenamento até duas semanas após o plantio.

A utilização de plântulas germinadas *in vitro* como material doador do tecido meristemático, diminui significativamente a contaminação por fungos e bactérias, aumentando a percentagem de mericlones quando comparado àqueles obtidos a partir de material crescido no campo, segundo dados de FRISON & NG (15).

#### 4.2. Cultura de Meristemas de cultivares de alho

Observou-se diferenças entre as cultivares com relação à facilidade na operação de remoção dos meristemas, sendo que nas de ciclo tardio o processo foi mais fácil e rápido, devido talvez ao vigor vegetativo das plântulas deste ciclo ser superior aos outros dois.

Todas as sete cultivares estudadas apresentaram um crescimento lento dos meristemas durante a primeira semana de cultivo, e este foi acelerado a partir da segunda semana, independente da cultivar usada. A partir da

terceira semana se estabeleceu uma dependência de uma combinação dos reguladores de crescimento BAP e ANA, variando de cultivar para cultivar.

#### 4.2.1. Altura dos mericlones

O termo mericlone é utilizado para caracterizar plantas oriundas de meristemas.

O Quadro 3, evidencia variações significativas na altura de mericlones entre cultivares e, em presença de diferentes concentrações de BAP e ANA.

Melhores resultados foram observados para a cultivar Amaranthe em presença de ANA-0,50 e BAP-0,00 ou 0,05 mg L<sup>-1</sup>, enquanto que para a cultivar Branco Mossoró, o tratamento ANA-0,50 e BAP-0,50 mg L<sup>-1</sup> forneceu mericlones mais desenvolvidos.

Concentrações inferiores de ANA foram exigidas pelas demais cultivares, a exemplo de 'Cateto Roxo' que mostrou maior altura dos mericlones com ANA-0,05 e 0,00 mg L<sup>-1</sup> na ausência de BAP e BAP-0,05 mg L<sup>-1</sup> na ausência de ANA. As cultivares Chinês, Chonan e Juréia tiveram um melhor comportamento na ausência de ANA e em meio acrescido de BAP-0,05; 0,50 e 0,50 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os dados evidenciam que 'Gigante Roxo' apresentou resultados mais promissores com ANA-0,05 na ausência de BAP e com BAP-0,05 mg L<sup>-1</sup>.

Observa-se no Quadro 3, que para doses de 5,00 mg L<sup>-1</sup> de ANA, em praticamente todas as cultivares, ocorreu um reduzido crescimento do meristema, e foi observado, aproximadamente 30 dias após a inoculação, uma formação de calos não friável, escuro e granuloso abaixo do meristema isolado. Estes dados confirmam os resultados de FRIBORG (14), de que concentrações muito altas de ANA induzem a formação e crescimento de calos nos tecidos.

QUADRO 3 - Resultados médios da altura de mericlones de sete cultivares de alho (*Allium sativum* L.) sob diferentes concentrações de BAP e ANA, aos 30 dias de idade. ESAL, Lavras-MG, 1988. <sup>1/</sup>

Cultivares	BAP [mg L <sup>-1</sup> ]	ANA [mg L <sup>-1</sup> ]			
		0,00	0,05	0,50	5,00
Amarante	0,00	1,13 Bd	3,50 Ab	4,37 Aa	1,98 Ac
	0,05	1,50 ABb	1,48 Bb	4,88 Aa	0,65 Bc
	0,50	1,17 Bb	1,60 Bb	3,38 Ba	1,55 ABb
	5,00	2,25 Ab	3,12 Aa	2,22 Cb	1,05 Bc
Branco Mossoró	0,00	1,77 Cb	2,60 Cab	3,38 Ca	1,67 Ab
	0,05	5,30 ABa	5,50 Aa	5,50 Ba	2,28 Ab
	0,50	6,25 Ab	4,25 Bc	7,63 Aa	2,50 Ad
	5,00	4,63 Bb	6,50 Aa	5,88 Ba	1,75 Ac
Cateto Roxo	0,00	1,87 Aa	2,13 Aa	0,60 Ab	0,37 Ab
	0,05	1,92 Aa	0,88 Bb	0,68 Ab	0,30 Ac
	0,50	1,42 Ba	0,75 Bb	0,45 Ab	0,57 Ab
	5,00	0,65 Ca	0,62 Ba	0,37 Aab	0,20 Ab
Chinês	0,00	5,30 Ba	5,18 Aa	3,80 ABa	3,88 Aa
	0,05	7,88 Aa	4,13 ABb	3,25 ABb	3,00 ABb
	0,50	5,62 Ba	2,67 Bb	2,80 Bb	1,90 Bb
	5,00	5,62 Ba	4,88 Aa	4,90 Aa	2,45 ABb

QUADRO 3 - Continuação

Cultivares	BAP [mg L <sup>-1</sup> ]	ANA [mg L <sup>-1</sup> ]			
		0,00	0,05	0,50	5,00
Chonan	0,00	3,30 Cbc	3,72 ABab	4,13 ABa	2,90 Ac
	0,05	4,13 Ba	3,03 Bb	4,53 Aa	2,40 Ab
	0,50	5,50 Aa	4,05 Ab	3,47 Bb	1,48 Bc
	5,00	2,67 Cb	3,25 Ba	2,97 Bab	1,13 Bc
Gigante Roxo	0,00	1,83 Bbc	3,80 Aa	2,35 Ab	1,45 Ac
	0,05	3,25 Ab	4,00 Aa	2,45 Ac	1,10 ABd
	0,50	1,75 Bbc	3,03 Ba	2,10 ABb	1,10 ABc
	5,00	1,50 Bb	3,42 ABa	1,60 Bb	0,70 Bc
Juréia	0,00	2,45 Cb	3,38 Aa	3,50 Aa	1,48 Ac
	0,05	3,22 Ba	3,80 Aa	3,22 Aa	0,65 Bb
	0,50	4,13 Aa	2,60 Bb	2,38 Bb	0,37 Bc
	5,00	3,22 Ba	2,22 Bb	2,33 Bb	0,20 Bc

1/ As médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para níveis BAP e minúsculas, para níveis de NAA) não diferem entre si pelo Tukey a 5%.

Em alguns casos BAP-5,00 mg L<sup>-1</sup> também mostrou efeitos negativos sobre o crescimento dos meristemas, concordando com observações de NOVÁK & HAVEL (29), de que em concentrações elevadas de BAP, na presença ou ausência de ANA, não ocorre uma formação normal dos meristemas.

Portanto, a formação de uma massa de calos durante o cultivo *in vitro* prejudicou o crescimento normal dos mericlones. Tal fato não ocorreu com aqueles meristemas cultivados em meio de cultura com concentrações menores de BAP e ANA.

Observou-se aos 30 dias de cultivo um comportamento diferenciado entre as cultivares (Quadro 3), sendo 'Chinês', 'Branco Mossoró' e 'Chonan' as que mostraram, em média, maior crescimento dos mericlones. A cultivar Cateto Roxo foi a que apresentou menor crescimento. Um crescimento intermediário foi observado por 'Gigante Roxo', 'Juréia' e 'Amarante'.

Todas as cultivares alcançaram, em média, alturas superiores as encontradas por MOSELLA CH. & FERNANDEZ M. (23), exceto quando doses mais elevadas de ANA (5,00 mg L<sup>-1</sup>) foram usadas sozinhas ou em combinação com BAP nas cultivares Juréia e Cateto Roxo. Ou quando foi usado 0,50 mg L<sup>-1</sup> de ANA sozinho ou em combinação com BAP na cultivar Cateto Roxo.

#### 4.2.2. Número de folhas

A partir dos resultados contidos no Quadro 4, para a cultivar Branco Mossoró, o melhor tratamento foi BAP-0,50 mg L<sup>-1</sup> que não diferiu significativamente de BAP-0,05 e 5,00 mg L<sup>-1</sup>, pelo teste de Tukey 5%. Para as cultivares Amarante, Cateto Roxo, Chinês e Juréia não se observou efeito significativo para as doses de BAP usadas.

QUADRO 4 - Número médio de folhas de mericlones de alho (*Allium sativum* L.) cultivares, Amaranate, Branco Mossoró, Cateto Roxo, Chinês e Juréia, sob diferentes concentrações de BAP. ESAL, Lavras-MG. 1988.<sup>1/</sup>

Cultivares	BAP (mg L <sup>-1</sup> )			
	0,00	0,05	0,50	5,00
Amarante	1,8 A	1,6 A	1,6 Á	1,7 A
Branco Mossoró	1,5 B	2,0 AB	2,3 A	2,0 AB
Cateto Roxo	1,4 A	1,3 A	1,4 A	1,2 A
Chinês	2,0 A	2,0 A	2,1 A	1,9 A
Juréia	1,5 A	1,4 A	1,1 A	1,2 A

1/ Médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo Tukey a 5%.

Observa-se no Quadro 5 que, não houve diferença significativa entre todas as doses de ANA usadas para cada uma das cultivares Amaranate, Branco Mossoró e Cateto Roxo. Maior número de folhas foi mostrado pelas cultivares Chinês e Juréia na ausência de ANA, não diferindo significativamente de ANA-0,05 e 0,50 mg L<sup>-1</sup>.

QUADRO 5 - Número médio de folhas de mericlones de alho (*Allium sativum* L.) cultivares: Amaranite, Branco Mossoró, Cateto Roxo, Chinês e Juréia, sob diferentes concentrações de ANA. ESAL, Lavras-MG, 1988. <sup>1/</sup>

Cultivares	ANA (mg L <sup>-1</sup> )			
	0,00	0,05	0,50	5,00
Amarante	1,8 A	1,7 A	1,7 A	1,2 A
Branco Mossoró	2,0 A	2,0 A	2,2 A	1,7 A
Cateto Roxo	1,4 A	1,5 A	1,2 A	1,3 A
Chinês	2,2 A	2,1 AB	1,9 AB	1,7 B
Juréia	1,5 A	1,4 AB	1,2 AB	1,0 B

<sup>1/</sup> Médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo Tukey a 5%.

A partir dos resultados contidos no Quadro 6, observa-se que para a cultivar Chonan, na ausência de ANA, melhores resultados foram mostrados por BAP-0,05 e 0,50 mg L<sup>-1</sup> não diferindo estatisticamente de BAP-0,00. Para ANA-0,05 e 0,50 mg L<sup>-1</sup> não houve diferença entre as doses de BAP, enquanto que com ANA-5,00 mg L<sup>-1</sup> maior número de folhas foi evidenciado na ausência de BAP, porém, sem diferença significativa para BAP-0,50 e 5,00 mg L<sup>-1</sup>.

A cultivar Gigante Roxo, na ausência de ANA, mostrou maior número de folhas em BAP-5,00 mg L<sup>-1</sup> não diferindo significativamente de BAP-0,00 e 0,05 mg L<sup>-1</sup>. Nas doses intermediárias (0,05 e 0,50 mg L<sup>-1</sup>) de ANA, a cultivar Gigante Roxo teve um comportamento similar em todas as doses de BAP. Para ANA-5,00 mg L<sup>-1</sup>, a presença de qualquer concentração de BAP se apresentou estatisticamente superior a ausência.



QUADRO 6 - Número médio de folhas de mericlones de alho (*Allium sativum* L.) cultivares Chonan e Gigante Roxo, sob diferentes concentrações de BAP e ANA. ESAL, Lavras-MG, 1988. <sup>1/</sup>

Cultivares	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	ANA (mg L <sup>-1</sup> )			
		0,00	0,05	0,50	5,00
Chonan	0,00	1,5 ABb	1,7 Aab	2,0 Aa	1,7 Aab
	0,05	2,0 Aa	2,0 Aa	2,2 Aa	1,0 Bb
	0,50	2,0 Aab	2,0 Aab	2,2 Aa	1,5 ABb
	5,00	1,0 Bb	1,7 Aab	2,0 Aa	1,2 ABb
Gigante Roxo	0,00	2,0 ABa	2,0 Aa	2,0 Aa	1,0 Bb
	0,05	2,0 ABab	2,2 Aa	2,5 Aa	1,5 Ab
	0,50	1,5 Bb	1,7 Ab	2,0 Aa	1,7 Ab
	5,00	2,5 Aa	2,0 Aa	2,0 Aa	1,5 Aa

<sup>1/</sup> Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha, não diferem entre si pelo Tukey a 5%.

No geral, estes resultados estão de acordo com afirmações feitas por NOVÁK et alii (31) de que o BAP induz a formação de brotos em cultura de meristemas de alho.

Estas diferenças, tanto para a altura de mericlones, como para o número de folhas foram, provavelmente, devido a variação genética existente entre as cultivares, uma vez que normalmente observa-se variações nas respostas de um genótipo para outro, devido a elevada plasticidade fenotípica, confirmando observações feitas por Jones & Mann, citados por SIQUEIRA et alii (39), de que variações podem ocorrer em respostas a interações com fatores ambientais. A Figura 2, evidencia estas diferenças observadas entre as diferentes cultivares testadas.

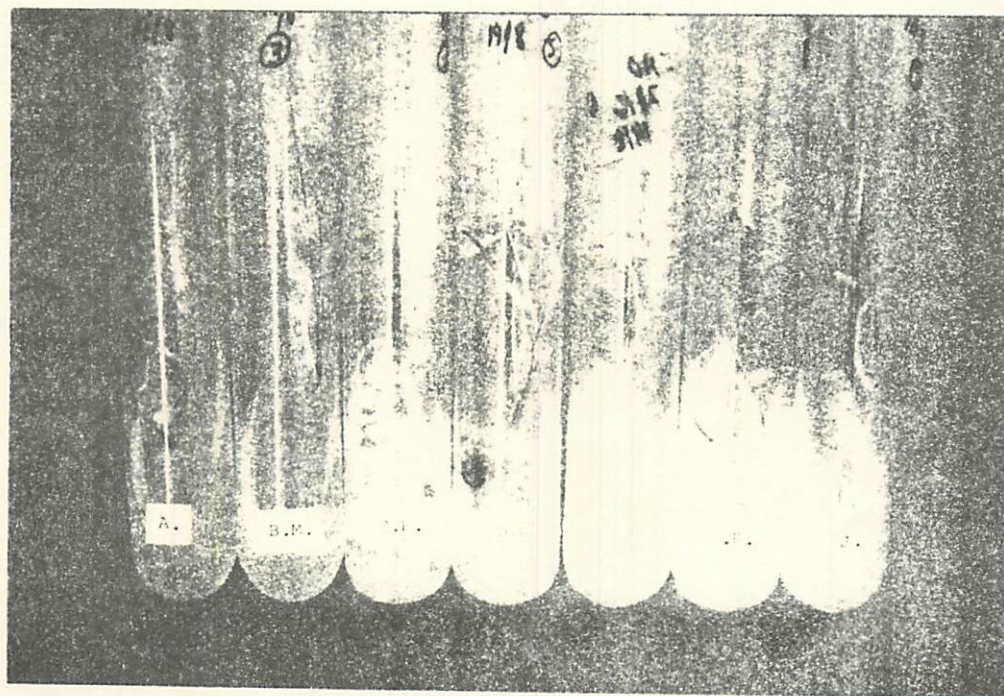


FIGURA 2 - Desenvolvimento comparativo de mericlones das diferentes cultivares de alho, em meio básico 'MS', na ausência de reguladores de crescimento, 30 dias após o início da cultura.

#### 4.3. Bulbificação *in vitro* da cultivar de alho Gigante Roxo

Mesmo tendo sido evidenciado um leve aumento no diâmetro e peso dos microbulbos obtidos *in vitro*, quando as concentrações de sacarose foram aumentadas, estes não diferiram estatisticamente entre si, pelo teste de F de Snecedor a 1%, o que pode ser observado no Quadro 7.

QUADRO 7 - Diâmetro e peso médio de microbulbos, obtidos *in vitro* de alho (*Allium sativum* L.) da cultivar Gigante Roxo, sob diferentes níveis de sacarose. ESAL, Lavras-MG, 1988.

Concentrações Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Parâmetros	
	Diâmetro (mm)	Peso (g)
30	5,6630	0,1468
60	6,0505	0,1838
120	6,2015	0,1843

No Quadro 8, observa-se que houve um pequeno aumento no diâmetro e no peso dos microbulbos a medida que concentrações de nitrogênio foram sendo reduzidas, porém, na ausência, uma pequena redução no diâmetro e peso dos microbulbos foi observada, embora não diferindo estatisticamente dos demais tratamentos pelo teste de F de Snecodor a 1%.

QUADRO 8 - Diâmetro e peso médio de microbulbos, obtidos *in vitro* de alho (*Allium sativum* L.) da cultivar Gigante Roxo, sob diferentes níveis de nitrogênio. ESAL, Lavras-MG, 1988.

Concentrações de Nitrogênio ( $\mu\text{M}$ )	Parâmetros	
	Diâmetro (mm)	Peso (g)
60	5,4780	0,1452
30	6,0520	0,1752
15	6,2920	0,1914
0	6,0647	0,1746

O Quadro 9, evidencia que o diâmetro e peso médio dos microbulbos, obtidos *in vitro*, não diferiram entre si, pelo teste de F de Snedecor a 1%, sob as diferentes concentrações de nitrogênio e sacarose usadas, o que também pode ser observado na Figura 3.

QUADRO 9 - Diâmetro e peso médio de microbulbos, obtidos *in vitro* de alho (*Allium sativum* L.) da cultivar Gigante Roxo, sob diferentes níveis de nitrogênio e sacarose. ESAL, Lavras-MG, 1988.

Tratamentos	Parâmetros	
	Diâmetro (mm)	Peso (g)
1 - 60 $\mu$ M Nitrogênio + 30 g sacarose	5,0560	0,1231
2 - 60 $\mu$ M Nitrogênio + 60 g sacarose	5,7220	0,1592
3 - 60 $\mu$ M Nitrogênio + 120 g sacarose	5,6560	0,1533
4 - 30 $\mu$ M Nitrogênio + 30 g sacarose	6,1920	0,1820
5 - 30 $\mu$ M Nitrogênio + 60 g sacarose	5,8580	0,1576
6 - 30 $\mu$ M Nitrogênio + 120 g sacarose	6,1060	0,1859
7 - 15 $\mu$ M Nitrogênio + 30 g sacarose	5,5720	0,1318
8 - 15 $\mu$ M Nitrogênio + 60 g sacarose	6,7960	0,2536
9 - 15 $\mu$ M Nitrogênio + 120 g sacarose	6,5080	0,1888
10 - N ausente + 30 g sacarose	5,8320	0,1500
11 - N ausente + 60 g sacarose	5,8260	0,1647
12 - N ausente + 120 g sacarose	6,5360	0,2091

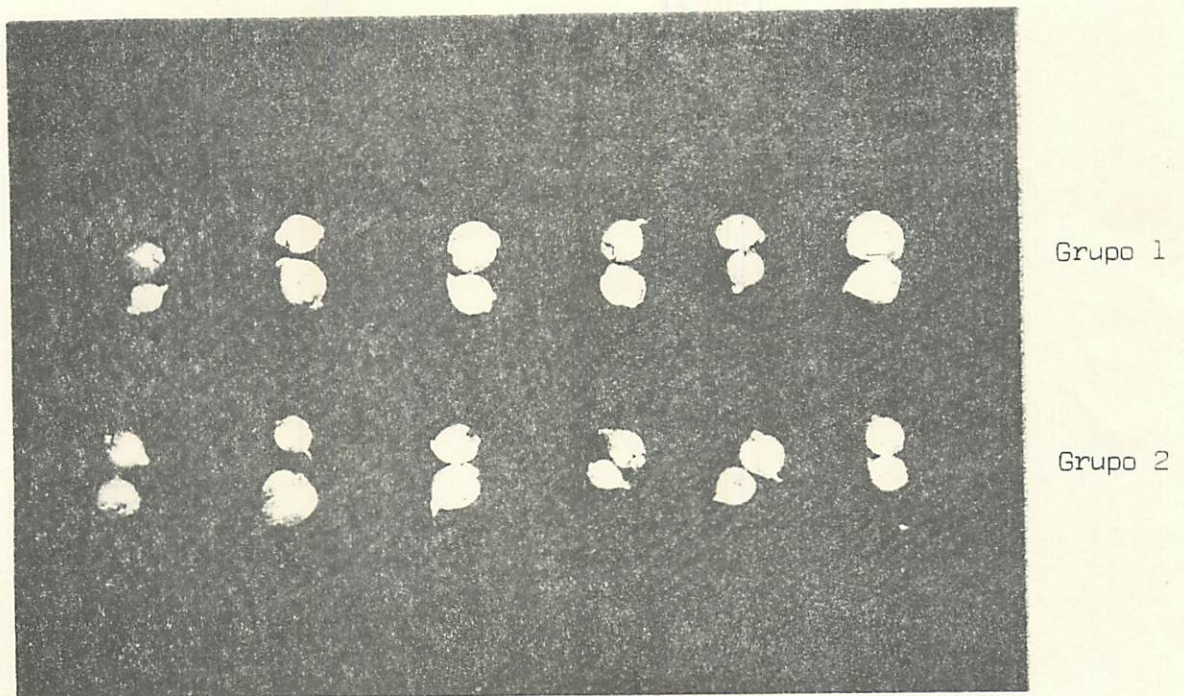


FIGURA 3 - Microbulbos de alho, cultivar Gigante Roxo, obtidos *in vitro*, sob diferentes concentrações de nitrogênio e sacarose.

Grupo 1 (Tratamentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6)

Grupo 2 (Tratamentos 7, 8, 9, 10, 11 e 12)

Os primeiros sinais mostrando o início da bulbificação foram observados 8 dias após a transferência para o meio de bulbificação, através do entumescimento da base das folhas, com uma coloração esbranquiçada que foi gradualmente aumentando de volume. Aos 30 dias, os microbulbos estavam formados e em estado de colheita, período este inferior ao observado por MOSELLA CH. & FERNANDEZ M. (23), devido talvez a cultivar que foi utilizada.

O ponto da colheita foi detectado pelo secamento geral das folhas e quando os microbulbos apresentaram formas e consistência tunicular semelhantes ao bulbo original, fatos que concordam com observações feitas por vários autores (05, 07, 09, 13, 20, 23, 25, 41, 42), que demonstraram ser estas as características ideais para determinar o ponto de maturação dos microbulbos.

Nos tratamentos em que o nitrogênio foi omitido, observou-se que as folhas dos mericlones apresentaram uma coloração verde menos intensa e um tamanho inferior àqueles de mericlones cultivados na presença de nitrogênio, conforme pode ser observado na Figura 4.

A opção pelo meio de cultura líquido foi determinada através de estudos preliminares. Confirmando resultados de DANIELS (09), de que os microbulbos crescidos em meio solidificado são de tamanho pequeno e apresentam um crescimento lento durante a sua formação.

Através de observações visuais periódicas, verificou-se que a obtenção de microbulbos maiores em menor período de tempo, parece ser melhorada quando mericlones foram cultivados em meio de cultura líquido.

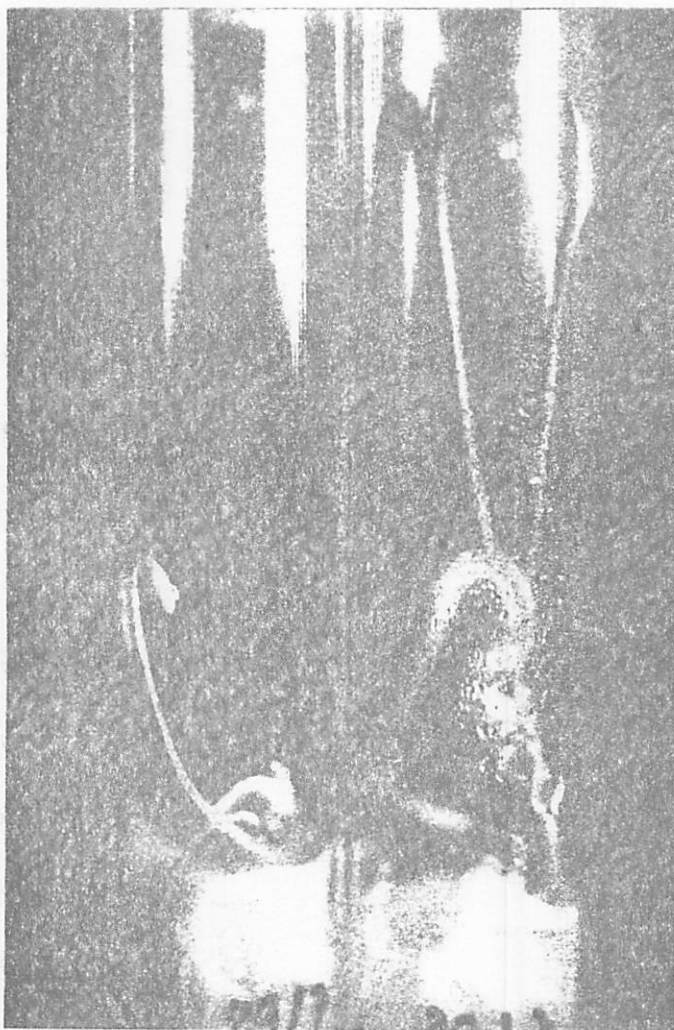


FIGURA 4 - Comparação de mericlones em que o nitrogênio foi omitido (esquerda) e mantido (direita).



#### 4.4. Germinação de microbulbos obtidos *in vitro* da cultivar de alho Gigante Roxo

De acordo com o Quadro 10, observa-se que houve diferença significativa no número de microbulbos obtidos *in vitro*, ao se usar diferentes tratamentos na quebra de dormência.

O maior número de microbulbos germinados foi obtido quando o tratamento de frigorificação a 5°C, por um período de 10 dias, foi usado. Os demais não diferiram estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

QUADRO 10 - Número médio de microbulbos germinados, submetidos a diferentes tratamentos de pré-germinação, aos 32 dias de idade. ESAL, Lavras-MG, 1988. <sup>1/</sup>

Tratamentos	Médias
A - Testemunha	4,5 B
B - 10 dias de frigorificação a 5°C	14,7 A
C - 5 dias de frigorificação a 5°C	7,2 B
D - 2 horas em água corrente	7,0 B
E - 4 horas em solução de GA <sub>3</sub>	4,7 B
F - 2 horas em solução de GA <sub>3</sub>	3,2 B

<sup>1/</sup> Médias seguidas da mesma letra são estatisticamente iguais. Tukey a 5%.

As equações de regressão para o número de microbulbos germinados para cada tratamento, em relação as épocas de avaliação, estão na Figura 5. A representação das mesmas foi do tipo linear para todos os tratamentos usados.

Os primeiros sinais de germinação dos microbulbos, foram observados 4 dias após o plantio, naqueles em que o tratamento de frigidificação a 5°C, por 10 dias, foi usado, e este alcançou 100% de germinação aos 22 dias após o plantio, o que não ocorreu para os demais.

Entretanto, 32 dias após o plantio, a maioria dos tratamentos apresentou uma taxa de germinação acima de 50%. Exceto o tratamento em que foi usado a imersão em solução de GA<sub>3</sub> por um período de 2 horas, o que veio a confirmar sugestões feitas por FERREIRA et alii (12) de que estes tratamentos podem ser usados na quebra de dormência de bulbilhos de alho.

A aplicação de baixas temperaturas por um período de 10 dias foi o tratamento mais eficiente e apresentou uma brotação mais rápida dos microbulbos, confirmando resultados de BURBA (06) e Ferreira e Cardoso, citados por TRINDADE (40), de que a frigidificação dos bulbos antes do plantio, promove maior precocidade de germinação. Este tratamento apresentou resultado superior ao obtido por SILVA & ALVARENGA (38) em que este período não foi suficiente para provocar efeitos significativos no desenvolvimento da planta. Diferença esta, devido talvez, a cultivar usada e também o tipo, tamanho e peso do material propagativo.

A - $Y = 0,34 + 0,0926 x$	$R^2 = 0,98$
B - $Y = 3,275 + 0,033875 x$	$R^2 = 0,88$
C - $Y = 0,77 + 0,09625 x$	$R^2 = 0,75$
D - $Y = 0,70 + 0,099125 x$	$R^2 = 0,98$
E - $Y = -0,95 + 0,112875 x$	$R^2 = 0,97$
F - $Y = 0,093125 x$	$R^2 = 0,89$

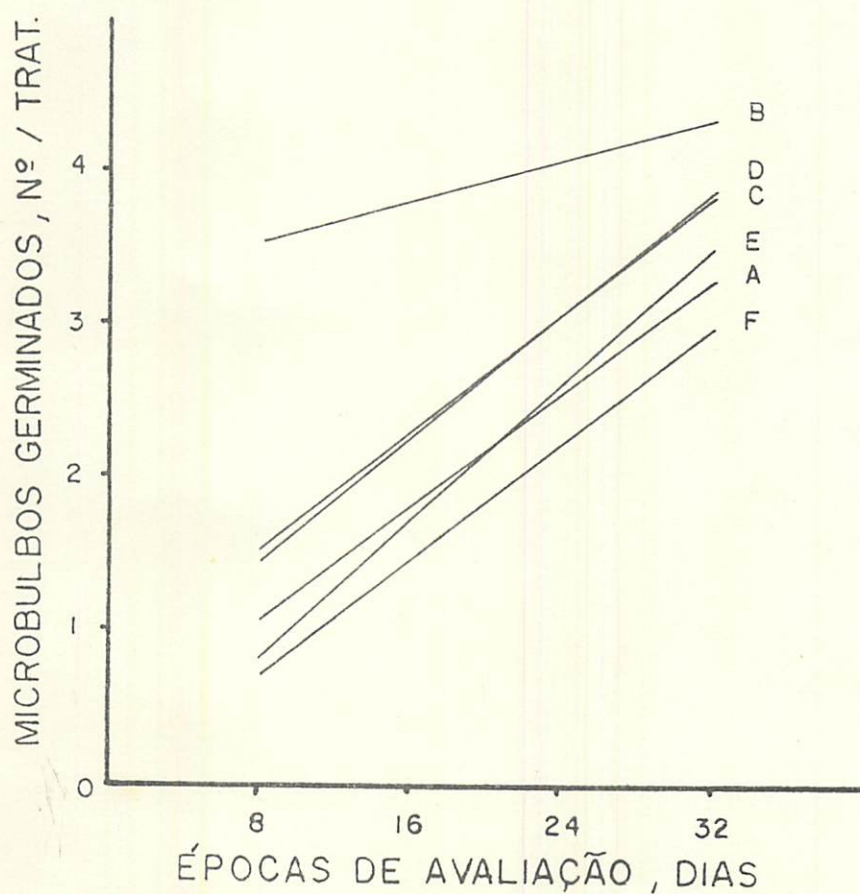


FIGURA 5 - Equações de regressão para cada tratamento de quebra de dormência de microbulbos de alho (*Allium sativum* L.) cv. Gigante Roxo, em quatro épocas de avaliação. ESAL, Lavras-MG, 1988.

## 5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, para as condições em que o presente trabalho foi desenvolvido, conclui-se que:

- a) Pode-se obter plântulas aptas para extração do tecido meristemático 4 dias após a inoculação dos bulbilhos em meio de germinação;
- b) O substrato algodão hidrófilo apresenta maior percentagem de germinação de bulbilhos do que a vermiculita;
- c) Não há efeito do meio de umedecimento sobre a percentagem de germinação dos bulbilhos, exceto para a cultivar Juréia, onde a água destilada apresenta melhor resultado;
- d) A regeneração de mericlones inicia-se 8 dias após a inoculação;
- e) Há uma tendência de melhor crescimento da parte aérea dos mericlones com BAP e ANA nas concentrações 0,00; 0,05 e 0,50 mg L<sup>-1</sup>. Concentrações mais elevadas (5,00 mg L<sup>-1</sup>) são prejudiciais e induzem a formação de calos;
- f) A microbulbificação inicia-se 8 dias após o recultivo, e microbulbos maduros são obtidos aos 30 dias;
- g) Peso e diâmetro dos microbulbos não são afetados pela redução nas fontes de nitrogênio e quantidades de sacarose, porém há uma redução na altura das plântulas quando as fontes de nitrogênio são reduzidas;

h) A quebra de dormência de microbulbos é obtida com mais eficiência e rapidez com tratamento a baixas temperaturas por um período de 10 dias.

## 6. RESUMO

O presente estudo objetivou testar diferentes técnicas utilizadas *in vitro* envolvendo a germinação de bulbilhos, cultura de meristemas, bulbificação e quebra de dormência dos microbulbos.

Bulbilhos de sete cultivares de alho (Amarante, Branco Mossoró, Cateto Roxo, Chinês, Gigante Roxo e Juréia) selecionados e desinfestados foram colocados para germinar em frascos contendo como substratos algodão hidrófilo e vermiculita, umedecidos com sais do 'MS' ou água destilada, totalizando 4 tratamentos, no escuro a  $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Melhores resultados foram obtidos quando usou-se algodão hidrófilo umedecido com água destilada.

Explantes constituídos de meristemas com 0,5 mm de tamanho, acompanhados de 1 primórdio foliar, provenientes de bulbilhos germinados *in vitro* das sete cultivares de alho, foram regenerados em meio 'MS' suplementado com todas as combinações possíveis de ANA e BAP, nas concentrações de 0,00; 0,05; 0,50 e 5,00  $\text{mg L}^{-1}$ . Houve um melhor crescimento de plântulas nas concentrações menores e formação de calos na concentração mais elevada (5,00  $\text{mg L}^{-1}$ ) dos reguladores de crescimento usados.

Mericlones de alho da cultivar Gigante Roxo, regenerados em meio 'MS' suplementado com 0,05  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP e ANA foram recultivados em meio 'MS' modificado, usando-se para constituir os 12 tratamentos, 4 concentrações de nitrogênio (60, 30, 15 e 0  $\mu\text{M}$ ) e 3 de sacarose (30, 60 e 120  $\text{g L}^{-1}$ ), na ausên-

cia de reguladores de crescimento. A microbulbificação iniciou-se 8 dias após o recultivo e microbulbos maduros foram obtidos aos 30 dias após o recultivo. Foram realizadas avaliações para diâmetro e peso dos microbulbos, estes após análise estatística, não apresentaram diferenças entre si.

Microbulbos da cultivar Gigante Roxo, obtidos no experimento anterior, após 30 dias de cura, foram misturados e divididos ao acaso em 6 grupos, contendo 17 microbulbos cada, para constituírem seis tratamentos de quebra de dormência (frigorificação a 5°C por períodos de 10 e 5 dias, lavagem em água corrente por 2 horas, imersão em solução de GA<sub>3</sub> por períodos de 4 e 2 horas e a testemunha). O plantio foi realizado em "sppedlings", utilizando substrato composto de solo, vermiculita, casca de Pinus e areia, esterilizados. O efeito dos tratamentos foi avaliado por 4 semanas consecutivas, tomando-se a porcentagem de microbulbos germinados. A quebra de dormência foi obtida com mais eficiência e rapidez quando baixas temperaturas, por um período de 10 dias foi usado.

## 7. SUMMARY

The present study aimed at testing different techniques used *in vitro* for clove germination, meristem culture, bulbing, and dormancy breaking of microbulbs.

Selected and desinfested bulbils from seven garlic cultivars (Amarante, Branco Mossoró, Cateto Roxo, Chinês, Chonan, Gigante Roxo and Juréia) were germinated in the dark at  $26 \pm 05^{\circ}\text{C}$  in vials containing as substrates hydrophilic cotton or vermiculite moistened with 'MS' salts or distilled water making up 4 treatments. Better results were obtained when hydrophilic cotton moistened with water was used.

Meristem explants, 0,5 mm long with 1 leaf primordium obtained from bulbils of the seven garlic cultivars germinated *in vitro* were regenerated in 'MS' medium supplemented with all possible combinations of NAA and BAP concentrations 0,00; 0,05; 0,50 and 5,00  $\text{mg L}^{-1}$ . There plantlet growth in the lower concentrations, and callus formation in the highest (5,00  $\text{mg L}^{-1}$ ) concentration of growth promoters tested.

Garlic mericlones from cultivar Gigante Roxo cultured in 'MS' medium supplemented with BAP and NAA 0,05  $\text{mg L}^{-1}$  were recultured in modified 'MS' medium containing 4 concentrations of the nitrogen (60, 30, 15 and 0  $\mu\text{M}$ ), and 3 of sucrose (30, 60, 120  $\text{g L}^{-1}$ ) without the addition of growth promoters



to make up 12 treatments. Microbulbing began 8 days after reculturing. Microbulbs diameter and weight were determined and not found to be statistically different after analysis.

Microbulbs from cultivar Gigante Roxo obtained in the previous experiment, after curing for 30 days, were mixed and randomly divided in 6 groups of 17 microbulbs each to make up 6 treatments of dormancy breaking (refrigeration at 5°C for 10 and 5 days periods, washing for 2 hours in tap water, immersion in GA<sub>3</sub> solution for 4 and 2 hour periods, and the control). Planting was done in speedlings filled with a compound sterilized substrate of soil, vermiculite, Pinus bark, and sand. The effect of the treatments was assessed for 4 consecutive weeks through the determination of percentage germinated microbulbs. Dormancy breaking was obtained more efficiently and rapidly when low temperatures were used for 10 days.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ABO F. IL, N.M. Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.). Plant Science Letteres, Limerick, 9:259-64, 1977.
02. ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL - 1986. Rio de Janeiro, FIBGE, v.47, 1986.
03. ARGUELLO, J.A.; BOTTINI, R.; BOTTINI, G.A. & RACCA, R.W. Dormancy in garlic (*Allium sativum* L.) cv. Rosado Paraguayo I. Level of growth substances in "seed cloves" under storage. Plant and Cell Physiology, Tokyo, 24(8):1559-63, Dec. 1983.
04. BHOJWANI, S.S. In vitro propagation of garlic by shoot proliferation. Scientia Horticulturae, Amsterdam, 13:47-52, 1980.
05. \_\_\_\_\_; COHEN, D. & FRY, P.R. Production of virus-free garlic and field performance of micropropagated plants. Scientia Horticulturae, Amsterdam, 18:39-43, 1982/83.
06. BURBA, J.L. Efeitos do manejo do alho semente (*Allium sativum* L.) sobre a dormência, crescimento e produção da cv. Chonan. Viçosa, UFV, 1983. 112p. (Tese MS).

07. CAMARGO, C.D. & BARRERA, P. Alho; uma planta mágica com um futuro garantido no mercado nacional. 2.ed. rev. e amp. São Paulo, Cone, 1985. 98p.
08. CARVALHO, M.G. Viroses do alho. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 12 (142):41-6, out. 1986.
09. DANIELS, J. Regeneração de clones de alho (*Allium sativum* L.) infectados por um Potyvírus. Brasília, UNB, 1977. 56p. (Tese MS).
10. DEROMEDIS, R.; CORAL, A.; LARRUSE, S. & TARENTI, O. Floracion de ajo (*Allium sativum* L.) en medio liquido y condiciones ambientales. Revista Industrial y Agrícola de Tucuman, Tucuman, 61(2):87-94, 1984.
11. DOLEZEL, J.; CÍHALÍKOVÁ, J. & NOVÁK, F.J. Sister chromatid exchange in garlic (*Allium sativum* L.) meristem roottip cells. Caryologia, Firenze, 39(1):41-9, Jan./Mar. 1986.
12. FERREIRA, F.A.; CASALI, V.W.D. & SOARES, J.G. Dormência dos bulbos de alho. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 12(142):3-8, out. 1986.
13. FILGUEIRA, F.A.R. Liliáceas condimentares. In: \_\_\_\_\_. Manual de Olericultura. São Paulo, Ceres, 1972. p.271-302.
14. FRIDBORG, G. Growth and organogenesis in tissue culture of *Allium cepa* L. var. proliferum. Physiologia Plantarum, Munksgaard, 25:436-40, 1971.
15. FRISON, E.A. & NG, S.Y. Elimination of sweet potato virus disease agents by meristem tip culture. Tropical Pest Management, Ibadan, 27(4):452-4, Apr. 1981.

16. GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture; handbook and directory of commercial laboratories. Eversley, Exegetics, 1984. 709p.
17. HAVRÁNEK, P. & NOVÁK, F.J. The bulb formation in the callus cultures of *Allium sativum* L. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, Jena, 68:308-18, 1973.
18. HUSSEY, G. In vitro propagation of the onion *Allium cepa* L. by axillary and adventitious shoots proliferation. Scientia Horticulturae, Amsterdam, 9:227-36, 1978.
19. \_\_\_\_\_ & FALAVIGNA, A. Origin and production in vitro adventitious shoots in the onion, *Allium cepa* L. Journal of Experimental Botany, London, 31(125):1675-86, Dec. 1980.
20. ILLG, R. & SIQUEIRA, W.J. Variação somaclonal em alho. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 12(142):12-7, out. 1986.
21. KEHR, A.E. & SCHAEFFER, G.W. Tissue culture and differentiation of garlic. Hortscience, Virginia, 11(4):422-3, Aug. 1976.
22. MAGALHÃES, J.R. Nutrição mineral do alho. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 12(142):20-30, out. 1986.
23. MOSELLA CH., L. & FERNANDEZ M., R. II cultivo in vitro del ajo (*Allium sativum* L.) tipo Rosado. Simiente, Santiago, 55(1/2):60-3, ene./jun. 1985.

24. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 15(3): 473-97, 1962.
25. NOME, S.F.; ABRIL, A. & RACCA, R. Obtención de plantas del ajo (*Allium sativum* L.) libres de virus mediante el cultivo de meristemas apicales. Phyton, Buenos Aires, 41(1/2):139-51, Oct. 1981.
26. \_\_\_\_\_ & SALVADORES, M.C. Obtención de plantas de batata (*Ipomoea batatas* (L.) LAM.) libres de virus. Revista de Ciências Agropecuárias, Córdoba, 1:9-21, jun. 1980.
27. NOVÁK, F.J. In vitro techniques in garlic (*Allium sativum* L.) breeding. In: \_\_\_\_\_. Use of tissue cultures in plant breeding. Prague, Institute of Experimental Botany, 1977. p.164-81. (Proceedings of the International Symposium, 1976, Olomouc).
28. \_\_\_\_\_. Production of garlic (*Allium sativum* L.) tetraplóides in shoot-tip in vitro culture. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung, Verlag Paul, Parey, 91:329-33, 1983.
29. \_\_\_\_\_ & HAVEL, L. Shoot production from in vitro cultured flower heads of *Allium porrum* L. Biologia Plantarum, Vodickova, 23(4):266-9, 1981.
30. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & DOLEZEL, J. *Allium*. In: EVANS, D.A. et alii. Handbook of plant cell culture. New York, Mac Millian, 1986. Cap.15, p.419-56.
31. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. In vitro breeding system of *Allium*. In: FUJIWARA, A., ed. Plant tissue culture. Maruzen, s.ed., 1982. p.767-8. (Proceedings 5th International Congress of Plant Tissue Culture).

32. PAIVA, E.; DANIELS, J.; ASSIS, M. de & CASTRO, L.A. Utilização de técnicas imunológicas para diagnose da virose causadora do estriado amarelo do alho. Pelotas, EMBRAPA-CNPFT, 1984. 3p. (Pesquisa em Andamento, 20).
33. QUAK, F. Meristem culture and virus-free plants. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., eds. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Berlin, Springer-Verlag, 1977. cap.5, p.598-615.
34. RESENDE, M.L.V. de. Quantificação, previsão e controle da podridão branca do alho (*Allium sativum* L.) com base no nível de escleródios de *Sclerotium cepivorum* Berk. no solo. Viçosa, UFV, 1985. 86p. (Tese MS).
35. RESENDE, R. de O. Cultura in vitro de meristemas de batata (*Solanum tuberosum* L.). Lavras, ESAL, 1985. 55p. (Tese MS).
36. SATURNINO, H.M. Propriedades químicas e uso do alho. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 4(48):64-67, dez. 1978.
37. SHYMOYA, C. Anatomia do bulbo do alho (*Allium sativum* L.) durante seu ciclo evolutivo. Revista Ceres, Viçosa, 27(92):102-18, abr./jun. 1970.
38. SILVA, J.L.O. & ALVARENGA, M.A.R. Efeito do choque frio sobre algumas características agrônômicas do alho 'Chonan'. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 20(9):1051-9, set. 1985.
39. 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, 44(1):357-74, 1985.

40. TRINDADE, M.B. Efeito do armazenamento de bulbilhos após frigorificação sobre o desenvolvimento e produção de bulbos de alho (*Allium sativum* L.) cv. Chonan. Lavras, ESAL, 1985. 63p. (Tese MS).
41. WALKEY, D.G.A.; WEBB, M.J.W.; BOLLAND, C.J. & MILLER, A. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*Allium ascalonicum* L.) by meristemtip culture. The Journal of Horticultural Science, Ashford, 62(2):211-20, Apr. 1987.
42. WERNER, R.A. Manejo pós-colheita do alho. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 12(142):46-9, out. 1986.

APÉNDICE



QUADRO 1A - Resumo das análises de variância para percentagem de germinação de alho Chinês, Chonan, Gigante Roxo e Juréia, em diferentes substratos e meios de umedecimento. ESAL, Lavras-MG, 1988.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância 1/						
		Amarante	Branco mossoró	Caleta roxo	Chines	Chonan	Gigante roxo	Juréia
Meio de umedecimento (M)	1	0,000192	0,000020	0,00	0,00	0,000570	0,000003	0,000250*
Substrato (S)	1	0,000088	0,000020	0,00	0,00	0,005014**	0,002161*	0,000250*
M x S	1	0,000192	0,000020	0,00	0,00	0,000032	0,000489	0,000046
Resíduo	20	0,000101	0,000008	0,00	0,00	0,000141	0,000435	0,000036
CV (%)		1,68	0,47	0,00	0,00	2,07	3,69	0,97
$\bar{x}$ (%)		96,60	99,17	100	100	77,50	68	95,42

1/ Dados transformados em  $\log (x/100 + 3)$

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

QUADRO 2A - Resumo das análises de variância para altura de mericlones de alho (*Allium sativum* L.) cultivares Amaranthe, Branco Mossoró, Cateto Roxo, Chinês, Chonan, Gigante Roxo e Juréia, sob diferentes concentrações de BAP e ANA, aos 30 dias de cultivo. ESAL, Lavras-MG, 1988.

Causas de Variação	GL	Quadrados médios e significância						
		Amarante	Branco mossoró	Cateto roxo	Chinês	Chonan	Gigante roxo	Juréia
BAP	3	1,9706**	25,3222**	1,6846**	6,4889**	4,4177**	2,5130**	1,8818**
ANA	3	19,1231**	36,8527**	4,1662**	31,1419**	12,7256**	16,6026**	22,7635**
BAP x ANA	9	3,4131**	4,5617**	0,6058**	34,2298*	2,3210**	0,5619**	1,5809**
Resíduo	48	0,1778	0,4038	0,0464	0,8958	0,1295	0,1307	0,1178
CV (%)		18,81	15,09	24,96	22,52	10,94	16,33	14,03
$\bar{X}$ (cm)		2,24	4,21	0,86	4,20	3,29	2,21	2,45

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

QUADRO 3A - Resumo das análises de variância para número de folhas de mericlones de alho (*Allium sativum* L.) cultivares Amaranite, Branco Mossoró, Cateto Roxo, Chinês, Chonan, Gigante Roxo e Juréia, sob diferentes concentrações de BAP e ANA, aos 30 dias de idade. ESAL, Lavras-MG, 1988.

Causas de Variação	GL	Quadrados médios e significância <sup>1/</sup>						
		Amarante	Branco mossoró	Cateto roxo	Chines	Chonan	Gigante roxo	Juréia
BAP	3	0,0436	0,2455**	0,0393	0,0224	0,0864*	0,0550*	0,0650
ANA	3	0,2002**	0,0872	0,0607	0,0839**	0,2665**	0,0426	0,1517*
BAP x ANA	9	0,0688	0,0455	0,0512	0,0318	0,0550*	0,1802**	0,0373
Resíduo	48	0,0387	0,0557	0,0357	0,0269	0,0210	0,0194	0,0376
CV (%)		15,53	17,11	16,55	11,70	11,09	9,97	17,23
$\bar{X}$		1,66	1,97	1,34	2,00	1,75	2,00	1,31

<sup>1/</sup> Dados transformados em  $\sqrt{x}$

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

QUADRO 4A - Resumo das análises de variância para diâmetro e peso de microbulbos, obtidos in vitro, de alho (*Allium sativum* L.) da cultivar Gigante Roxo, em diferentes concentrações de sacarose e fontes de nitrogênio. ESAL, Lavras-MG, 1988.

Causas de Variação	GL	Quadrados médios e significância	
		Diâmetro (mm)	Peso (g)
Sacarose (S)	2	1,5431	0,00926
Nitrogênio (N)	3	1,8071	0,00556
S x N	6	0,7204	0,00569
Resíduo	48	0,8856	0,00491
CV (%)		15,76	40,82
$\bar{X}$		5,97	0,1716

QUADRO 5A - Resumo da análise de variância e regressão de microrbulos germinados in vitro, cultivar Gigante Roxo, em função dos tratamentos empregados, nas quatro épocas de avaliação. ESAL, Lavras-MG, 1988.

Causas de variação		GL	Quadrados médios dos Parâmetros
Tratamentos		5	2,19**
Épocas		(3)	(4,98)**
. Linear		1	14,86**
. Quadrática		1	0,09
. Cúbica		1	0,002
Resíduo		15	0,182
CV (%)			16,47

\*\* significativo a 1%