

BENEDITA MARIA RODRIGUES

**MICROPROPAGAÇÃO E BULBIFICAÇÃO *IN VITRO* DE
CEBOLA (*Allium cepa* L.)**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura de Lavras, como parte das exigências do
Curso de Mestrado em Agronomia, área de
concentração em Genética e Melhoramento de Plantas,
para obtenção do título de "MESTRE".

Orientador

Prof. JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1994**

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFLA

Rodrigues, Benedita Maria.

Micropropagação e bulbificação in vitro de cebola (*Allium cepa* L.) / Benedita Maria Rodrigues. --
Lavras : ESAL, 1994.

109p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura de Lavras.

Bibliografia.

1. Cebola - Melhoramento genético. 2. Cebola - Micropropagação. 3. Cebola - Bulbificação in vitro. 4. Cebola - Reguladores de crescimento. 5. Cebola - Cultura de tecidos. I. ESAL. II. Título.

CDD - 635.253

BENEDITA MARIA RODRIGUES

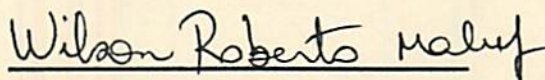
**MICROPROPAGAÇÃO E BULBIFICAÇÃO *IN VITRO* DE
CEBOLA (*Allium cepa* L.)**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura de Lavras, como parte das exigências do
Curso de Mestrado em Agronomia, área de
concentração em Genética e Melhoramento de Plantas,
para obtenção do título de "MESTRE".

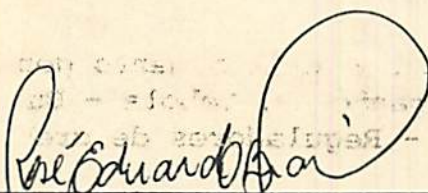
APROVADA em 25 de novembro de 1994



Prof. César A. Brasil P. Pinto



Prof. Wilson Roberto Maluf
(Co-orientador)



Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
(Orientador)

À Deus

Aos meus pais Sebastião (in memórian) e Suzana

Aos meus irmãos Célia e Mauro

Ao meu cunhado Carlos

Aos meus sobrinhos Luiz Henrique e Miriam

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo.

Ao Instituto Agronômico de Campinas - IAC, pela oportunidade e incentivo para a realização do curso.

À Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, pela oportunidade concedida.

À Coodenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Professor José Eduardo B.P. Pinto, pela orientação, incentivo, amizade e confiança demonstrados durante o curso.

Ao Professor Wilson Roberto Maluf pelos ensinamentos transmitidos, participação e sugestões apresentados.

Ao Professor César Augusto B. P. Pinto pelos ensinamentos, amizade, participação e valiosas sugestões para o enriquecimento deste trabalho.

Aos Professores do curso Lisete Chamma Davide, João Bosco dos Santos, Magno A. P. Ramalho, Moacyr Pasqual e demais Professores, pelos ensinamentos, disponibilidade e amizade demonstrados.

Aos pesquisadores e amigos do Instituto Agronômico de Campinas - IAC, pela colaboração e incentivo.

Ao Sérgio Toshio Otubo, amigo e companheiro em todos os momentos convívios.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Sérgio Toshio, Joaquim, Marcelo Tavares, Daniel, Dehon, Elaine, Maria Rosa, Elias, Cláudio, Valéria, Marcelo, Otoniel, Guilherme, Luciana, Eduardo, Leonardo Rosse, José Sérgio, Paulo Martins, Oswaldo, Erich, Paulo, Farias, João Acássio, Vilma, Giovana, Patrícia, Leonardo, Luciane, Renata, Ângela, Hélia, Maurício, André, Cláudia e demais colegas pelo convívio e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos, Renato, Rui, Clóvis, Aurora, Francisco, Harley, Poliana, Solange, Wantuil, Ewaldo, Marly, Magno; aos amigos do Laboratório de Citologia e demais colegas pela alegria do convívio, auxílios prestados e solidariedade em todos os momentos.

Aos funcionários da Biblioteca da ESAL, pelo atendimento e correção das referências bibliográficas.

Aos funcionários do Departamento de Biologia e Agricultura, pelos auxílios prestados e a todos aqueles que, de algum modo, contribuíram para o êxito deste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

BENEDITA MARIA RODRIGUES, filha de Sebastião Lino Rodrigues e Suzana Barbosa Rodrigues, nasceu em Socorro, SP, em 13 de agosto de 1957.

Concluiu o curso de Biologia pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas - PUCCAMP, SP, em dezembro de 1982.

Em novembro de 1988 foi contratada pelo Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, para atuar na Área de Biotecnologia.

Em março de 1992 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas, na Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, MG, concluindo em novembro de 1994.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvi
SUMMARY	xix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.2 OBJETIVO GERAL	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
2 CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO PARA O ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE EXPLANTES DE BULBOS DE CEBOLA	5
RESUMO	5
2.1 REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.2 OBJETIVO	8
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	8
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
2.5 CONCLUSÕES	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
3 PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> CEBOLA (<i>Allium cepa</i> L.) A PARTIR DE TECIDOS DE BULBOS	17
RESUMO	17
3.1 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1.1 TÚNICAS UNIDAS POR SEGMENTO BASAL	20
3.1.2 BROTO E MERISTEMAS	22
3.2 MICROPROPAGAÇÃO DE CEBOLA A PARTIR DE SEGMENTOS BASAIS DE BULBOS	24
3.2.1 OBJETIVO	24
3.2.2 MATERIAL E MÉTODOS	24

	Página
3.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.2.4 CONCLUSÕES	32
3.3 MICROPROPAGAÇÃO A PARTIR DE GEMAS CAULINARES	32
3.3.1 OBJETIVO	32
3.3.2 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.3.4 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
4 FATORES QUE INFLUENCIAM NA BULBIFICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CEBOLA (<i>Allium cepa</i> L)	40
RESUMO	40
4.1 REFERENCIAL TEÓRICO	41
4.2 EFEITO DA TEMPERATURA NA BULBIFICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	45
4.2.1 OBJETIVO	45
4.2.2 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.2.4 CONCLUSÕES	50
4.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA BULBIFICAÇÃO <i>IN VITRO</i> ...	50
4.3.1 OBJETIVO	50
4.3.2 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.3.4 CONCLUSÕES	62
4.4 EFEITO DA CONSISTÊNCIA DO MEIO DE CULTURA E DO DIÂMETRO DA BASE DA PLÂNTULA NA BULBIFICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	64
4.4.1 OBJETIVO	64
4.4.2 MATERIAL E MÉTODOS	64
4.4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.4.4 CONCLUSÕES	73
4.5 EFEITO DE DIFERENTES FOTOPERÍODOS E CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO NA BULBIFICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	74
4.5.1 OBJETIVO	74
4.5.2 MATERIAL E MÉTODOS	74
4.5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.5.4 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
5 REGENERAÇÃO DE PLÂNTULAS A PARTIR DE BULBINHOS INDUZIDOS <i>IN</i> <i>VITRO</i>	88
RESUMO	88
5.1 REFERENCIAL TEÓRICO	89
5.2 OBJETIVO	90
5.3 MATERIAL E MÉTODOS	90
5.3.1 EFEITO DO BAP X ANA NA MICROPROPAGAÇÃO A PARTIR DE BULBINHOS OBTIDOS <i>IN VITRO</i>	90

5.3.2 MICROPROPAGAÇÃO ATRAVÉS DE BULBINHOS DESENVOLVIDOS EM MEIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE	91
5.3.3 INFLUÊNCIA DO TAMANHO DO BULBINHO NA FREQUÊNCIA DE REGENERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	91
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
5.4.1 EFEITO DO BAP X ANA NA MICROPROPAGAÇÃO A PARTIR DE BULBINHOS OBTIDOS <i>IN VITRO</i>	94
5.4.2 MICROPROPAGAÇÃO ATRAVÉS DE BULBINHOS DESENVOLVIDOS EM MEIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE	96
5.4.3 INFLUÊNCIA DO TAMANHO DO BULBINHO NA FREQUÊNCIA DE REGENERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	98
5.5 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
6 CONCLUSÕES GERAIS	106

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Porcentagem de explantes contaminados ou não quando desinfestados previamente com hipoclorito de sódio (NaClO) a pH 11,5 ou pH 6,0.	12
2 Porcentagem de explantes contaminados ou não quando desinfestados previamente com duas concentrações de NaClO, variando o tempo de imersão, contendo ou não antibiótico na água de lavagem	13
3 Resumo das análises de variância para porcentagem de regeneração e número médio de brotos por explante da cultivar Pira Ouro	26
4 Resumo das análises de variância para porcentagem de regeneração e número médio de brotos por explantes a partir de bulbos da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 60 dias	30
5 Porcentagem de regeneração e número médio de brotos por bulbos da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 60 dias	31
6 Número médio de brotações em três subcultivos das cultivares Pira Ouro e Baia Piriforme no meio MS suplementado com BAP (0,1 mg/L) x AIB (1,0 mg/L) em intervalos de 30 dias	35
7 Resumo das análises de variância para diâmetro do bulbinho e altura das plântulas, da cultivar Pira Ouro Pirana Precoce mantidas em duas temperaturas. Avaliação aos 60 dias	47
8 Resumo das análises de variância para diâmetro de bulbinho e da haste, taxa de bulbificação e altura das plântulas da cultivar Pira Ouro e do Híbrido-120 obtidas em diferentes concentrações de sacarose. Avaliação aos 60 dias	52
9 Médias observadas para diâmetro do bulbinho, da haste, taxa de bulbificação e altura das plântulas da cultivar Pira Ouro e do Híbrido-120, em diferentes concentrações de sacarose. Avaliação realizada aos 60 dias	61

Tabela	Página
10	Resumo das análises de variância para diâmetro de bulbinho, da haste, taxa de bulbificação e peso de matéria fresca de bulbinhos da cultivar Pira Ouro e do Híbrido-120 obtidos em diferentes concentrações de sacarose. Avaliação aos 180 dias 54
11	Médias observadas para o diâmetro do bulbinho e da haste, taxa de bulbificação e peso da matéria fresca de bulbinhos da cultivar Pira Ouro e do Híbrido-120 em diferentes concentrações de de sacarose. Avaliação realizada aos 180 dias 56
12	Total de plântulas desenvolvidas a partir de bulbinhos obtidos <i>in vitro</i> , ao final do processo de aclimação da cultivar Pira Ouro e do Híbrido-120. Avaliação aos 60 dias 61
13	Resumo das análises de variância para diâmetro de bulbinho, diâmetro da haste, taxa de bulbificação e altura das plântulas das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce, obtidos a partir de explantes com diferentes diâmetros, em meio sólido e líquido, no decorrer das avaliações 66
14	Resumo das análises de variância para diâmetro de bulbinho e da haste, taxa de bulbificação, altura das plântulas das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce, obtidos a partir de explante com diferentes diâmetros, em meio sólido e líquido. Avaliação aos 90 dias 70
15	Influência do diâmetro da base da plântula (explante) sobre o diâmetro do bulbinho e diâmetro da haste, das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce, no decorrer das avaliações 71
16	Influência do diâmetro da base do explante sobre o diâmetro do bulbinho da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 90 dias 72
17	Concentrações de NH_4 , NO_3 , Nitrogênio Total em mM, relação NO_3/NH_4 e taxa de NO_3/NH_4 na indução de bulbificação <i>in vitro</i> de cebola 75
18	Resumo das análises de variância para diâmetro de bulbinho e da haste, taxa de bulbificação, altura das plântulas e número de raízes dos bulbinhos da cultivar Pira Ouro, obtidos em diferentes fotoperíodos com três níveis de nitrogênio, no decorrer das avaliações 76
19	Resumo das análises de variância para diâmetro de bulbinho e da haste, taxa de bulbificação, altura das plântulas e número de raízes dos bulbinhos da cultivar Pira Ouro, obtidos em diferentes fotoperíodos com três níveis de nitrogênio. Avaliação aos 60 dias 82
20	Efeito das doses de nitrogênio total sobre as médias do diâmetro de bulbinho e da haste, taxa de bulbificação, altura das plântulas e número de raízes da cultivar Pira Ouro. Avaliação realizada aos 60 dias 82

Tabela		Página
21	Porcentagem de regeneração de plântulas a partir de bulbinho colocado em diferentes posições no meio de cultura	94
22	Porcentagem de regeneração dos explantes em meio contendo diferentes concentrações de BAP x ANA	95
23	Número médio de brotos regenerados por explante em diferentes concentrações de BAP x ANA. Avaliação aos 80 dias	95
24	Resumo das análises de variância para porcentagem de regeneração e número médio de brotos por explante de bulbinhos da cultivar Pira Ouro e Híbrido-120, originados em diferentes concentrações de sacarose, em meio MS com BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L). Avaliação aos 80 dias	97
25	Porcentagem de regeneração e número médio de brotos por explantes de bulbinhos da cultivar Pira Ouro e Híbrido-120 desenvolvidos em diferentes concentrações de sacarose em meio MS com BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L). Avaliação aos 80 dias	97
26	Resumo das análises de variância para frequência de regeneração (%) e número médio de brotos por bulbinho das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce. Avaliação aos 40 dias	99
27	Frequência de regeneração (%) de explantes e número de brotos por bulbinho das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce. Avaliação aos 40 dias	99
28	Resultados médios do peso de matéria fresca, peso de matéria seca, número de túnicas, frequência de regeneração e número de brotos por bulbinho da cultivar Pira Ouro	101
29	Resultados médios do peso de matéria fresca, peso de matéria seca, número de túnicas, frequência de regeneração e número de brotos por bulbinho da cultivar Pirana Precoce	101
30	Resultados das correlações entre peso da matéria fresca (P.M.F.), peso da matéria seca (P.M.S.), número de túnicas (N.T.), frequência de regeneração (F.R.) e número de brotos por bulbinho (N.B.), das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce. Avaliação aos 40 dias	103

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efeito das concentrações de ANA sobre a porcentagem de regeneração e número médio de brotos por explante de tecido basal de bulbo da cultivar Pira Ouro, durante as avaliações	27
2	Regeneração de explantes de tecido basal da cultivar Pira Ouro em meio com BAP (0,5 e 4,0 mg/L) e plântulas desenvolvidas aos 60 dias de avaliação	28
3	Porcentagem de regeneração e número médio de brotos por explantes no decorrer das avaliações da cultivar Pira Ouro	29
4	Efeito das concentrações de ANA sobre o número médio de brotos por explante de tecido basal de bulbo da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 60 dias .	30
5	Frequência de regeneração das plântulas provenientes de gemas caulinares das cultivares Pira Ouro e Pera em meio MS com diferentes combinações de BAP x AIB. Avaliação aos 30 dias	34
6	Taxas de multiplicação observadas a partir de gemas das cultivares Pira Ouro (A) e Baía Piriforme (B), inoculadas no meio MS suplementado com BAP (0,1 mg/L) e AIB (1,0 mg/L), após o 1º, 2º e 3º subcultivos	37
7	Diâmetro dos bulbinhos (mm) e altura das plântulas (mm) das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce mantidas em duas temperaturas	48
8	Bulbificação <i>in vitro</i> das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce, em duas condições de temperatura	49
9	Efeito de concentrações de sacarose sobre o diâmetro dos bulbinhos e taxa de bulbificação da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 60 dias	53
10	Efeito de concentrações de sacarose sobre a altura das plântulas da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 60 dias	54
11	Efeito de concentrações de sacarose sobre o diâmetro dos bulbinhos da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 180 dias	55

Figura		Página
12	Efeito de concentrações de sacarose sobre o peso da matéria fresca dos bulbinhos e taxa de bulbificação da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 180 dias	55
13	Efeito das concentrações de sacarose sobre a bulbificação <i>in vitro</i> da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 60 dias	57
14	Efeito de concentrações de sacarose sobre a altura das plântulas do híbrido intervarietal (H-120). Avaliação aos 60 dias	58
15	Efeito de concentrações de sacarose sobre o diâmetro dos bulbinhos do híbrido intervarietal (H-120). Avaliação aos 180 dias	58
16	Efeito de concentrações de sacarose sobre a taxa de bulbificação e peso da matéria fresca dos bulbinhos do híbrido intervarietal (H-120). Avaliação aos 180 dias	59
17	Bulbinhos da cultivar Pira Ouro e o Híbrido-120 obtidos em diferentes concentrações de sacarose. Avaliação aos 180 dias. A e B - Folhas bem secas e com películas externa de cor creme; C e D - Amostra dos diferentes tratamentos; E - Aclimação em vermiculita; F - Plantas no solo em casa-de-vegetação	63
18	Comportamento do diâmetro de haste das plântulas e da taxa de bulbificação da cultivar Pira Ouro no decorrer das avaliações	66
19	Comportamento da altura das plântulas e do diâmetro dos bulbinhos da cultivar Pira Ouro, em meio sólido e líquido, no decorrer das avaliações	68
20	Comportamento dos diâmetros das hastes e dos bulbinhos da cultivar Pirana Precoce, em meio sólido e líquido, no decorrer das avaliações	68
21	Comportamento da taxa de bulbificação e altura das plântulas da cultivar Pirana Precoce, em meio sólido e líquido, no decorrer das avaliações	69
22	Comportamento da taxa de bulbificação de plântulas com diferentes diâmetros basais da cultivar Pirana Precoce no decorrer das avaliações	69
23	Amostra de bulbinhos com maior diâmetro das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce desenvolvidos em meio sólido e líquido	73
24	Comportamento da taxa de bulbificação das plântulas da cultivar Pira Ouro, em diferentes fotoperíodos, no decorrer das avaliações	77
25	Número de raízes das plântulas da cultivar Pira Ouro, em diferentes fotoperíodos, no decorrer das avaliações	77

Figura		Página
26	Comportamento do diâmetro da haste de plântulas da cultivar Pira Ouro, em diferentes fotoperíodos, no decorrer das avaliações	78
27	Comportamento da altura das plântulas da cultivar Pira Ouro, em diferentes fotoperíodos, no decorrer das avaliações	78
28	Comportamento do diâmetro dos bulbinhos das plântulas da cultivar Pira Ouro no decorrer das avaliações	79
29	Comportamento do diâmetro dos bulbinhos das plântulas da cultivar Pira Ouro, em função de diferentes fotoperíodos	79
30	Comportamento do diâmetro dos bulbinhos e taxa de bulbificação da cultivar Pira Ouro, em função de diferentes fotoperíodos. Avaliação aos 60 dias	81
31	Número de raízes e altura das plântulas da cultivar Pira Ouro, em função de diferentes fotoperíodos. Avaliação aos 60 dias	81
32	Bulbinhos da cultivar Pira Ouro desenvolvidos em três condições de fotoperíodo e três níveis de nitrogênio A (60,0 mM), B (39,4 mM) e C (18,8 mM). Avaliação aos 60 dias	84
33	Bulbinhos das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce dentro dos diâmetros P (< 5,0 mm); M (5,0 a 10,0 mm) e G (> 10,0 mm)	92
34	Obtenção de explante a partir de bulbos. A - bulbo adulto; B e C - toaleta e corte transversal; D - toaleta nas laterais; E e F segmento com $\pm 1 \text{ mm}^2$; G - segmento seccionado duas vezes resultando em 4 explantes	108
35	Esquema de multiplicação cíclica a partir de bulbo adulto e bulbinho <i>in vitro</i>	108

LISTA DE ABREVIATURAS

ANA = ácido naftalenoacético

AIA = ácido indolacético

AIB = ácido indolbutírico

BA = benzyl adenina

BAP = 6-benzilaminopurina

BDS = uma modificação do meio B5 (Gamborg et al., 1968) com aumento dos níveis de fosfato e nitrogênio, e diminuição do nível de 2,4-D (Dunstan e Short, 1977 a,b).

2ip = 6 dimetil alil amino purina

MS = Murashige & Skoog

LS = Linsmayer & Skoog

RESUMO

RODRIGUES, Benedita Maria. **Micropropagação e bulbificação *in vitro* de cebola (*Allium cepa* L.)**. Lavras: ESAL, 1994. 109p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

A cebola (*Allium cepa* L.) apresenta um mecanismo de macho-esterilidade genético-citoplasmática, presente em baixa frequência nas populações, que poderá viabilizar a produção de híbridos comerciais. A maior dificuldade é a manutenção dos indivíduos macho-estéreis, a qual só será possível através da criação de linhas mantenedoras ou através das técnicas de culturas de tecidos. Este trabalho objetivou o estudo de metodologias básicas para micropropagação de plântulas da cultivar Pira Ouro e Pirana Precoce visando a produção de híbridos. Para aumentar a eficiência da esterilização da água sanitária foram testados o pH 11,5 ou pH 6,0 com diferentes tempos de imersão. A maior porcentagem de explantes sem contaminação (87,5%) foi observada em pH 6,0 com imersão durante 1:30 h. O uso de duas assepsias com a segunda variando a concentração de NaClO e tempo de imersão utilizando ou não antibiótico na água de lavagem foram verificadas. Ausência de contaminação foi observada para 1% NaClO por 5 minutos utilizando antibiótico na água de lavagem.

Como explantes primários foram utilizados segmentos de disco basal e gemas caulinares. Segmentos basais da cultivar Pira Ouro foram inoculados em meio MS com BAP

* Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto. Membros da banca: Wilson Roberto Maluf e César Augusto Brasil Pereira Pinto.

(0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L) x ANA (0,0; 0,5 e 1,0 mg/L). O desenvolvimento de brotações foi observado em todas as combinações de BAP x ANA. A maior frequência de regeneração (60%) ocorreu em BAP (2,0 mg/L) x ANA (1,0 mg/L), e maior número de brotos por explante (5,15) em BAP (4,0 mg/L) x ANA (1,0 mg/L), com uma taxa de multiplicação de 20,60 brotos por bulbo em 60 dias. Gemas caulinares das cultivares Pira Ouro e Baia Piriforme foram inoculadas em meio MS suplementado com BAP (1,0 e 2,0 mg/L) x AIB (0,0; 0,5 e 1,0 mg/L). A maior taxa de multiplicação para 'Pira Ouro' foi em meio BAP (2,0 mg/L) x AIB (0,5 mg/L), com 6,5 brotos, e para 'Baia Piriforme' foi BAP (1,0 mg/L) x ANA (1,0 mg/L) com 2,6 brotos por gema.

Na micropropagação a partir de explantes secundários toma-se necessário a indução de bulbificação *in vitro*. Explantes secundários das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce foram inoculados em meio MS com 60 g/L de sacarose e mantidos em 25° e 30°C. Maior desenvolvimento dos bulbinhos ocorreu em 30°C e 12/12 horas de luz e escuro. Explantes secundários de Pira Ouro e do Híbrido-120 foram inoculados em meio MS com 30, 60, 90 e 120 g/L de sacarose. Maiores diâmetros de bulbinho, da haste, taxa de bulbificação, peso de matéria fresca e menor altura das plântulas, foram observados em 90 e 120 g/L como também maior sobrevivência na fase de aclimação.

Explantes obtidos de bulbinho *in vitro* das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce com diâmetro basais < 2,0 mm; de 2,0 a 3,0 mm e > 3,0 mm foram inoculados em meio MS, sólido e líquido, com 90 g/L de sacarose e mantidos no fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro e temperatura de 30°C. A microbulbificação foi observada nos dois meios, no entanto as maiores médias para diâmetro do bulbinho e da haste, taxa de bulbificação e altura das plântulas foram observadas no meio sólido a partir de plântulas com diâmetros basais maior que 2,0 mm. Explantes secundários da cultivar Pira Ouro foram inoculados no meio MS com 120 g/L de sacarose, nitrogênio total: 60,0; 39,4 e 18,8 mM e mantidos em 8/16, 12/12 e

16/8 horas de luz/escuro. Bulbinhos mais desenvolvidos, com menor diâmetro da haste, maior taxa de bulbificação, menor altura das plântulas e maior número de raízes foi observado de 16/8 horas de luz/escuro, não observando portanto o efeito entre as doses de nitrogênio.

Bulbinhos induzidos *in vitro*, das cultivaras Pira Ouro e Pirana Precoce foram inoculados em meio MS suplementado com BAP (2,0 e 4,0 mg/L) x ANA (0,25 e 0,5 mg/L). Para porcentagem de regeneração a cultivar Pira Ouro apresentou o mesmo comportamento nas doses de BAP x ANA, e a cultivar Pirana Precoce mostrou melhores respostas nas combinações de BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L) e BAP (4,0 mg/L) x ANA (0,5 mg/L). As duas cultivares apresentaram maior número de brotos por explante em BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L), com uma taxa de multiplicação de 9,6 e 16,8 brotos por bulbinho para Pira Ouro e Pirana Precoce, respectivamente.

Maior porcentagem de regeneração e número de brotos por explantes foram observados para os bulbinhos desenvolvidos em 120 g/L de sacarose tanto para a cultivar Pira Ouro como para o Híbrido-120.

Visando determinar a influência do tamanho do bulbinho sobre taxa de multiplicação, bulbinhos das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce foram classificados em P (< 5,0 mm), M(5,0 a 10,0 mm) e G (> 10,0 mm) e inoculados em meio MS suplementado com BAP x ANA. A cultivar Pira Ouro apresentou maior frequência de regeneração (39,70%) e maior número de brotos (4,91) no diâmetro G, e na cultivar Pirana Precoce a maior porcentagem de regeneração (86,44%) e maior número de brotos por bulbinho (15,44) foram observados no diâmetro M.

SUMMARY

MICROPROPAGATION AND BULBIFICAÇÃO *IN VITRO* OF ONION (*Allium cepa* L.)

Onion (*Allium cepa* L.) shows a genetical cytoplasmatic male sterility present in a low frequency in populations, which will enable to become viable the production of commercial hybrids. The major obstacle is the maintenance of male-sterile individual, that will only be possible through the generation of maintainer lines or through the tissue culture. This work intended to investigate the micropropagation of explants from Pira Ouro and Pirana Precoce cultivar aiming to the hybrid production. To improve the efficiency of sterilization of domestic bleach pH 11.5 or pH 6.0 with different immersion time were tested. The best sterilization was obtained with pH 6.0 and immersion time of 1:30 h with 87.5% without contamination. The use of two asepsises with the batter ranging its concentration of NaClO and immersion time utilizing or not antibiotic in the washing water were observed. No contamination was observed for NaClO 1% with immersion time of 5 minutes utilizing antibiotic in the washing water.

As primary explants were used sections of basal discs and stem buds. Basal sections of ther Pira Ouro cultivar were inoculated on MS medium supplemented with BAP (0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg/L) x NAA (0.0; 0.5 and 1.0 mg/L). The development of shoots was observed in all combination of BAP x NAA. The highest regeneration frequency (60%) took place in BAP (2.0 mg/L) x NAA (1.0 mg/L) and greatest number of shoots per explant (5.15) in BAP (4.0 mg/L) x NAA (1.0 mg/L) with multiplication rate of 20.60 shoots per bulb in 60 days.

Stem buds from Pira Ouro and Baia Piriforme cultivars inoculated on MS medium supplemented with BAP (1.0 and 2.0 mg/L) x IBA (0.0; 0.5 and 1.0 mg/L). The highest multiplication rate for 'Pira Ouro' was on MS medium (2.0 mg/L) x IBA (0.5 mg/L), with 6.5 shoots and for 'Baia Piriforme' was BAP (1.0 mg/L) x NAA (1.0 mg/L) with 2.6 shoots.

Micropropagation from secondary explants makes necessary to induce bulblets *in vitro*. Secondary explants from Pira Ouro and Pirana Precoce cultivars were inoculated on MS medium with 60 g/L of sucrose and maintained at 25°C and 30°C. The bulblets occurred at 30°C and 12/12 hours high/dark. Secondary explants of 'Pira Ouro' and Hybrid-120 were inoculated on MS medium with 30, 60, 90 and 120 g/L of sucrose. The concentration of 90 and 120 g/L of sucrose increased diameters of bulblets, stems, bulbing rate, dry matter weight and lowered height of plantlets the phase of acclimation.

Plantlets obtained from *in vitro* bulblet of the Pira Ouro and Pirana Precoce cultivars with different basal diameter 2.0 mm; 2.0 to 3.0 mm and > 3.0 mm were inoculated on MS medium, solid and liquid, with 90 g/L of sucrose and maintained in the photoperiod of 12/12 hours light/dark and at 30°C temperature. Microbulbing was reported in both media. The highest averages for diameter of bulblet and stem, rate of bulbing and height of plantlets were observed in solid medium from plantlets with basal diameter larger than 2.0 mm. Secondary explants on cultivar Pira Ouro were inoculated into the MS medium with 120 g/L of sucrose, total nitrogen: 60.0; 39.4 and 18.8 mM and held at 8/16, 12/12 and 16/8 hours light/dark. The best developed bulblets, with smaller stem diameter, greater bulbing rate, smaller height of the plantlets and greater number of roots were observed from 16/8 hours light/dark. It was not observed nitrogen effect on bulblet development.

Bulblets from *in vitro* of the Pira Ouro and Pirana Precoce cultivars were inoculated on MS medium supplemented with BAP (2.0 and 0.5 mg/L) x NAA (0.25 and 0.5 mg/L). 'Pira Ouro' showed the similar percentage of regeneration in all concentration of BAP

and NAA, therefore 'Pirana Precoce' obtained the best regeneration in just two concentrations of BAP (2.0 mg/L) x NAA (0.25 mg/L) and BAP (4.0 mg/L) x NAA (0.5 mg/L). The two cultivars showed higher number of shoots per explant in BAP 2.0 mg/L x NAA (0.25 mg/L), with a rate multiplication of 9.6 shoots per bulblet for Pira Ouro and 16.8 shoots a bulblet for Pirana Precoce.

The highest regeneration percentage and number of shoots per explants were observed for the bulblets developed into 120 g/L both for the Pira Ouro cultivar and Hybrid-120.

To determine the influence of bulblet size on the multiplication rate, bulblets from the Pira Ouro and Pirana Precoce cultivars were used in the three size P (< 5.0 mm), M (5.0 to 10.0 mm) and G (> 10.0 mm). Pira Ouro cultivar presented greatest frequency of regeneration (39.70%) and greatest number of shoots (4.91) at G diameter. Pirana Precoce cultivar showed the greatest percentage of regeneration (86.44%) and greatest number of shoots per bulblet (15.44) at the M diameter.

1 INTRODUÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma espécie diplóide ($2n = 16$), pertencente à família Amaryllidaceae (ex-Liliaceae) ou Alliaceae (a qual congrega mais de 600 espécies), não sendo porém conhecida a sua forma selvagem. É uma espécie alógama, predominantemente entomófila, sendo executada principalmente por abelhas, embora outros insetos como vespas e moscas participem do processo (Muller e Casali, 1983).

Apresenta como centro de origem primário (Vavilov, 1963 e Wendelbo, 1971) a Ásia, incluindo a região do Paquistão e do Afeganistão (devido à maior variabilidade genética do gênero *Allium* ali encontrada) e como centro de origem secundário o Oriente Médio e a região do Mediterrâneo.

Sua introdução no Brasil foi realizada pelos colonizadores europeus, principalmente portugueses, inicialmente no litoral do Rio Grande do Sul. Posteriormente foi difundida para outras regiões, sendo hoje cultivada do Nordeste ao Extremo Sul do país (Campos, 1969).

Atualmente a cebola é cultivada em quase todo o mundo e apresenta um papel de relevância por ser utilizada como hortaliça condimentar ou in natura. O Brasil tem ocupado a 6ª posição dentre os maiores produtores mundiais, ocupando aqui a 3ª posição dentre as hortaliças nacionais de maior importância econômica e maior consumo, sendo superada apenas pelo tomate e a batata.

A cebola apresenta um mecanismo de macho-esterilidade do tipo genético-citoplasmático, o qual geralmente está presente em baixa frequência nas populações. A macho-esterilidade em cebola, descoberta por Jones em 1925 (citada por Jones e Clark, 1943), é de fundamental importância, e tem viabilizado a produção de sementes híbridas a nível comercial.

Em cebola a exemplo de outras hortaliças, embora o preço das sementes híbridas seja mais elevado, um pequeno aumento na produção já cobre o custo da semente, além também do híbrido apresentar outras vantagens como uniformidade, precocidade e facilidade de colheita, contribuindo assim para regularizar a escassez do produto na entressafra, principalmente na região Centro-Sul.

Essa macho-esterilidade é devida a interação entre um gene recessivo nuclear (ms) e um fator citoplasmático (S). O genótipo de uma planta macho-estéril típica apresenta a seguinte constituição: S msms. Esta macho-esterilidade apresenta também genes nucleares restauradores da fertilidade de expressão dominante (MsMs) e (Msms), podendo resultar nos seguintes genótipos:

S MsMs - fértil
 S Msms - fértil
S msms - Macho-estéril
 N MsMs - fértil
 N MsMs - fértil
 N msms - fértil

A manutenção de indivíduos macho-estéreis só será possível utilizando-se de linhas similares (quase isogênicas), geneticamente estéreis e com citoplasma fértil (N msms).

Uma das grandes dificuldades encontradas é a obtenção das linhas mantenedoras, com citoplasma normal (N msms), pois além de ser um processo demorado e demandar mão-de-obra especializada, em geral o número de mantenedoras obtido é pequeno

e não necessariamente com boa capacidade de combinação, limitando a obtenção de híbridos comerciais.

A utilização das técnicas de cultura de tecidos poderá facilitar a manutenção e propagação *in vitro* de indivíduos macho-estéreis, viabilizando assim a produção de sementes híbridas sem o uso de linhas mantenedoras (Maluf et al., 1988). As linhas macho-estéreis poderão ser obtidas já no primeiro ano e conseqüentemente maior número poderão também ser testadas quanto à capacidade de combinação.

Vale salientar que algumas cultivares de cebola foram obtidas a partir de cruzamentos envolvendo plantas macho-estéreis de Baia Piriforme e portanto, apresentam citoplasma estéril (S). Neste caso, como o das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce, torna-se impossível a criação de linhas mantenedoras (Comunicação pessoal W.R. Maluf).

1.2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo principal a definição de uma metodologia básica para obtenção, micropropagação e manutenção de plântulas de cebola das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce a partir de bulbos, visando posteriormente a manutenção de plântulas macho-estéreis para produção de sementes híbridas comerciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPOS, H.R. **Instruções para a cultura da cebola**. 2.ed. Campinas, Instituto Agronômico, 1969. 32 p. (Boletim, 164).
- 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.

MALUF, W.R.; CALDAS, L.S.; TOMA BRAGHINI, M.; CORTE, R.D.; IKUDA, H.; KUNIEDA-YABASE, M. Alternatives to current tropical cauliflower hybrids obtained from self-incompatible inbred lines. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.11, p.905-910, 1988.

MULLER, J.J.V.; CASALI, V.W.D. **Produção de sementes de cebola**. Florianópolis: EMBRAPA, 1982. 64 p. (Boletim Técnico, 16).

VAVILOV, N.I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. In: **ONION AND THEIR ALLIES: BOTANY, CULTIVATION AND UTILIZATION**. London: Leonard Hill Books, 1963. p.286.

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

2 CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO PARA O ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTE DE BULBOS DE CEBOLA

RESUMO

Para a obtenção de maior porcentagem de explantes sem contaminação bacteriana no estabelecimento da cultura *in vitro* de cebola a partir de bulbos, foram realizados dois experimentos. No primeiro, avaliou-se a eficiência do pH 11,5 (normal) e pH 6,0 da água sanitária com diferentes tempos de imersão. O pH 6,0 com imersão durante 1:30 h mostrou maior porcentagem de explantes sem contaminação (87,50). No segundo experimento foram realizadas duas assepsias, variando a segunda na concentração de NaClO e tempos de imersão, bem como na presença ou não de antibiótico na água de lavagem. Maior porcentagem de explantes sem contaminação foi observada para 1% de NaClO durante 5 minutos na presença (100%), ou não (13,75%), de antibiótico na água de lavagem (100%).

2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

Uma das grandes dificuldades encontradas na fase de estabelecimento de culturas *in vitro* é a contaminação causada por fungos, bactéria e vírus patogênicos. Existem uma série de fatores que podem contribuir para a contaminação responsável pela redução da taxa de multiplicação, redução da taxa de enraizamento e causar até morte em cultura de

tecidos de plântulas, dentre eles destacam-se a ineficiência de métodos utilizados para a desinfestação de superfícies de explantes primários (PhytaSource, 1994).

Para o gênero *Allium* encontram-se descritos na literatura uma variação de metodologias utilizadas para a desinfestação de bulbos, dentes e tecidos florais. Para bulbos e dentes, todo o tecido vindo abaixo do agente esterilizante são usualmente removidos, e consequentemente o uso de altas concentrações por longo período de tratamento, não causa efeito prejudicial sobre a viabilidade do explante (Novak, Havel e Dolezel, 1986).

A maioria dos experimentos usando bulbos e dentes como fonte de explante primário utilizaram inicialmente imersão em 70% de etanol por 8-10 minutos, imersão em 6-7% de solução de hipoclorito de cálcio por 30 minutos (Fridborg, 1971; Dunstan e Short, 1977a; Havranek e Novak, 1973; Nome, Abril e Racca, 1981); imersão em 70% de álcool por 10 minutos e 6% de hipoclorito de sódio por 30 minutos (Dunstan e Short, 1977b); imersão em 5% de hipoclorito de sódio por 15 minutos (Gizawy e Ford-Lloyd, 1987); 70% de etanol por 5-10 minutos, 40-50% de solução branqueadora de hipoclorito de sódio comercial por 5-10 minutos, dependendo do tamanho do explante (Lu, Currah e Peffley, 1989).

Para tecidos de bulbos, alguns trabalhos tem mostrado resultados eficientes utilizando apenas etanol, seguido da remoção do tecido superficial (Hussey, 1978; Hussey e Falavigna, 1980); ou etanol seguido de flambagem, para dentes de alho (Bhojwani, 1980).

O etanol e hipoclorito de sódio têm sido utilizados também para tecidos florais de cebola porém com tempo de imersão menor ou concentrações menores (Dunstan e Short, 1979; Mohamed-Yasseen, Splittstoesser e Litz, 1993). A substituição do hipoclorito de sódio por cloramine B foi adotada para tecidos florais de alho (Novak e Havel, 1981), e após a remoção da espátula, dividiu-se o receptáculo floral em quatro partes, sendo repetida a assepsia com 3% de hipoclorito de cálcio.

Geralmente os explantes utilizados na micropropagação *in vitro* podem ser obtidos de plantas matrizes (lenhosas), mantidas em casa-de-vegetação ou no campo. No entanto, quando o material vegetal é proveniente do campo, a chance de contaminação é muito maior (Pierik, 1987).

O uso de Benomyl tem sido indicado para o controle de contaminação fúngica, pois este apresenta amplo espectro de ação e é pouco tóxico às culturas (Grattapaglia e Machado, 1990). Bons resultados foram obtidos por Tricoli, Mainard e Drew (1985), quando explantes de *Prunus serotina* EHRH coletados no campo foram tratados através de imersão em solução contendo 1,5 g/L do princípio ativo Benomyl. Carvalho, Pinto e Pasqual (1990) também conseguiram redução de até 30% de contaminação fúngica em brotações de *Eucalyptus grandis* HILL ex MAIDEN, quando utilizaram 0,05 g/L do princípio ativo Benomyl suplementado ao meio de cultura. Mohamed-Yasseen, Splittstoesser e Litz (1994), utilizaram para o alho, e chalota imersão em 70% de etanol por 2 a 3 segundos, Benomyl 2 g/L por 10 minutos e 0,79% de hipoclorito de sódio por 10 minutos.

A utilização de antibiótico em cultura de tecidos geralmente se faz para o controle de contaminações bacterianas endógenas ou não, as quais representam um sério problema no estabelecimento de algumas culturas. Os antibióticos utilizados devem manter sua capacidade bactericida em meio nutritivo, não ser tóxico às células vegetais e ter o mais amplo espectro de ação (Grattapaglia e Machado, 1990). Phillips, Amott e Kaplan (1981), trabalhando com seis antibióticos, verificaram que somente a Rifampicina a 50 mg/L, controlou as bactérias deliberadamente introduzidas em culturas de *Helianthus tuberosus*, sem afetar a taxa de divisão celular, a diferenciação de elementos de xilema e a síntese de DNA nos explantes.

Leifert et al. (1992), verificaram que a contaminação bacteriana de cultura de tecidos de *Delphinium* pode ser reduzida em mais que 50% pela acidificação do meio de cultura de pH 5,6 para 3,5.

2.2 OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo determinar uma metodologia para a desinfestação do material vegetal, visando obter maior porcentagem de explantes isentos de contaminação no estabelecimento da cultura *in vitro*.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Experimento 1. Efeito da água sanitária (2% hipoclorito de sódio) com pH 11,5 ou pH 6,0 em diferentes tempos de imersão.

No presente experimento foram utilizados bulbos da cultivar Pira Ouro com aproximadamente 100 dias de pós-colheita e diâmetros variando entre 30 a 40 mm, obtidos de ensaio de avaliação de germoplasma, realizada pelo Departamento de Agricultura da ESAL.

Inicialmente, os bulbos foram preparados através da retirada das cascas, corte das raízes, seguido de lavagem em água corrente e detergente por 30 minutos. Posteriormente, foram seccionados a 15 - 20 mm de altura da base, procedendo em seguida o corte das túnicas nas laterais da superfície pré-cortada, a fim de eliminar os tecidos de reserva.

Os segmentos previamente preparados foram submetidos às seguintes situações:

a) imersão em solução de detergente comercial por 30 minutos;

b) imersão em solução contendo 2,0 g/L do princípio ativo Benomyl por 2 - 3 horas;

c) imersão em álcool 70% por 1 minuto;

d) imersão em água sanitária (2% NaClO) com pH 11,5 (normal) ou pH ajustado para 6,0 com HCl concentrado, correspondendo aos seguintes tratamentos:

pH 11,5		pH 6,0	
Tratamentos	Tempo (horas)	Tratamentos	Tempo (horas)
A	1:00	F	0:30
B	1:30	G	1:00
C	2:00	H	1:30
D	2:30	I	2:00
E	3:00	J	2:30

e) lavagem com água bidestilada e esterilizada por 3 vezes.

As situações de c a e foram realizadas em câmara de fluxo laminar horizontal e toda a vidraria e instrumentos utilizados como pinças e bisturis, foram previamente esterilizados em autoclave horizontal à temperatura de 120°C e 1 atmosfera de pressão.

Os segmentos após a realização dos tratamentos, tiveram as camadas externas (parte basal e túnica) seccionadas a fim de eliminar possíveis tecidos danificados pela desinfestação, mantendo-se apenas um segmento de 10 mm², o qual foi seccionado por duas vezes no sentido longitudinal, eliminando-se a gema principal e resultando em 4 explantes.

Experimento 2. Efeito de duas assepsias com NaClO sobre explantes de bulbos.

Neste experimento foram utilizados bulbos da cultivar Baia Piriforme provenientes do Rio Grande do Sul e adquiridos no comércio.

Os segmentos previamente preparados (como já descrito no experimento 1) foram submetidos à duas etapas de assepsia, sendo a primeira a seguinte:

- a) imersão em álcool 70% por 30 segundos;
- b) imersão em NaClO 2% por 5 minutos;
- c) lavagem com água destilada e autoclavada por 3 vezes.

Após esses passos, foram realizados cortes procurando-se eliminar possíveis tecidos danificados da parte basal e túnicas, mantendo-se apenas segmentos de 10 mm², os quais foram seccionados duas vezes no sentido longitudinal, eliminando-se a gema principal, e resultando em quatro explantes, os quais foram submetidos a uma segunda assepsia com:

- a) imersão em álcool 70% por 30 segundos;
- b) imersão em NaClO, com diferentes concentrações e tempos, correspondendo aos tratamentos de A a F, sendo que nos tratamentos B, D, F os explantes foram lavados com solução bactericida contendo 1.500 ppm de cloranfenicol. O preparo desta solução se deu através da retirada de uma alíquota de 1 ml da solução comercial Quemicetina correspondendo a 0,15g de cloranfenicol, com o auxílio de uma seringa e agulha previamente esterilizados, para um volume final de 100 ml de água previamente esterilizada, sendo que todo o processo foi realizado em câmara de fluxo laminar. As diferentes concentrações e tempos de imersão seguem abaixo:

Tratamentos	NaClO (concentração)	Tempo de imersão (minutos)	cloranfenicol	
			Ausência	Presença
A	2%	1	X	
B	2%	1		X
C	2%	2	X	
D	2%	2		X
E	1%	5	X	
F	1%	5		X

c) lavagem por 3 vezes com água destilada e autoclavada (sómente os tratamentos que não foram submetidos à lavagem com antibiótico). Vale salientar que as duas assepsias foram realizadas em câmara de fluxo laminar horizontal.

Os explantes do experimento 1 e 2 foram em seguida inoculados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 13,0 ml do meio MS (1962), sacarose 30 g/L e ágar 7,0 g/L, após o pH ter sido ajustado para 5,9. Os tubos contendo meio foram previamente esterilizados em autoclave horizontal a 120°C e 1 atmosfera de pressão, por 20 minutos.

O experimento foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas de luz e escuro, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e aproximadamente 1.000 lux de luminosidade.

Aos 7 dias avaliou-se a porcentagem de contaminação e dos explantes inoculados.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento (Tabela 1), verifica-se que nos tratamentos onde se utilizou o pH normal do hipoclorito (pH 11,5), a porcentagem de explantes com contaminação foi maior em relação aos tratamentos onde se utilizou o pH 6,0. As menores porcentagens de explantes sem contaminação e verdes (12,5%) foram observadas nos tratamentos D e E, onde se utilizou hipoclorito com pH 11,5 nos períodos de 2:30 e 3:00 horas de imersão, respectivamente. No entanto estes períodos prolongados de imersão também causaram clorose nos tecidos (D e E). As grandes perdas de explantes se deram sómente por contaminações bacterianas. A baixa porcentagem de explantes sem contaminação e verdes, observada nos tratamentos cujo tempo de imersão foram maiores, discordam das afirmações citadas por Novak, Havel e Dolezel (1986), de que altas concentrações do agente esterilizante

agindo por longo período de tempo não prejudicam a viabilidade do explante. Neste caso não só prejudicou a viabilidade como também mostrou baixa eficiência. A redução do pH de 11,5 para 6,0 foi mais eficiente em controlar a contaminação bacteriana (Tabela 1), onde a maior porcentagem de explantes não contaminados e verdes (87,50) foi observada no tratamento H (pH 6,0 e imersão por 1:30 h), concordando com os resultados obtidos por Leifert et al. (1992), onde a contaminação de tecidos de *Delphinium* foi reduzida em mais de 50% pela acidificação do meio de cultura. Isto se deve ao fato da capacidade de esterilização ou a efetividade do hipoclorito de sódio ser influenciado pelo conteúdo de HClO disponível na solução. Quando o pH da solução é alto, o conteúdo de ClO^- é aumentado e HClO é reduzido, diminuindo portanto a capacidade de esterilização. Em outras palavras, um nível de pH baixo, até que a estabilidade permita, é mais eficiente em controlar a contaminação. Pode ser observado na Tabela 1, que períodos de imersão prolongados a pH 6,0, também causaram clorose nos tecidos (tratamentos I e J).

TABELA 1. Porcentagem de explantes contaminados ou não quando desinfestados previamente com hipoclorito de sódio (NaClO) a pH 11,5 ou pH 6,0.

Tratamento	pH	Período imersão (horas)	Contaminados (%)	Não contaminados (%)	
				verdes	cloróticos
A	11,5	1:00	79,17	20,83	0,00
B	11,5	1:30	66,67	33,33	0,00
C	11,5	2:00	75,00	25,00	0,00
D	11,5	2:30	75,00	12,50	12,50
E	11,5	3:00	70,83	12,50	16,67
F	6,0	0:30	25,00	75,00	0,00
G	6,0	1:00	16,67	83,33	0,00
H	6,0	1:30	12,50	87,50	0,00
I	6,0	2:00	16,67	79,33	4,00
J	6,0	2:30	12,67	70,83	16,50

Verifica-se no segundo experimento (Tabela 2) que a utilização de duas assepsias juntamente com a utilização de antibiótico na água de lavagem mostraram-se eficientes, controlando melhor a presença de bactérias no estabelecimento da cultura *in vitro* de disco basal de cebola.

TABELA 2. Porcentagem de explantes contaminados ou não quando desinfectados previamente com duas concentrações de NaClO, variando o tempo de imersão, contendo ou não antibiótico na água de lavagem.

Trat.	NaClO (%)	Tempo imersão (minutos)	Antibiótico na água de lavagem	Contaminados (%)	Não contaminados (%)
A	2	1	A	18,75	81,25
B	2	1	P	11,76	88,24
C	2	2	A	43,75	56,25
D	2	2	P	18,75	81,25
E	1	5	A	6,25	93,75
F	1	5	P	0,00	100,00

A: presente

P: presente

Nota-se que os melhores resultados foram observados quando se utilizou na segunda assepsia imersão durante 5 minutos em NaClO (1%) - Tratamento E e lavagem dos explantes com solução bactericida - Tratamento F. A eficiência do antibiótico na água de lavagem pode ser observada pela superioridade das porcentagens de explantes sem contaminação dos tratamentos B, D e F, nos três tempos de imersão utilizados.

Lu, Currah e Peffey (1989), utilizando etanol e hipoclorito de sódio na assepsia de tecidos de disco basal concluíram que a contaminação está também associada com outros fatores como condição do campo, estação do ano, desenvolvimento das plantas e tempo de pós-colheita dos bulbos, e observaram que os maiores níveis de contaminação ocorreram nos meses mais frios enquanto os menores níveis, nos meses mais quentes, quando o crescimento vegetativo é mais vigoroso, onde quase 100% dos explantes foram obtidos.

A baixa porcentagem de explantes não contaminados observada na Tabela 1, com a utilização de álcool e NaClO podem também estar associadas a outros fatores como os mencionados por Lu, Currah e Peffley (1989), fazendo com que os tratamentos utilizados não sejam eficientes, necessitando muitas vezes estar associados a outros, como por exemplo ao uso de agentes esterilizantes mais potentes, ao uso de pH mais ácido ou a associação com antibióticos.

Uma das alternativas que também tem sido utilizada para amenizar a contaminação *in vitro*, é através do uso de plantas matrizes, mantidas em casa-de-vegetação, tomando-se os seguintes cuidados: prevenção de infestação por insetos, evitando a transmissão de doenças; prevenção ao ataque de fungos e bactérias utilizando-se fungicidas sistêmicos e bactericidas e também controle de umidade, para evitar a reprodução e disseminação dos microorganismos, no entanto, vale salientar que o uso de plantas matrizes nem sempre é possível.

2.5 CONCLUSÕES

Concluimos que para desinfestação de tecidos de bulbos de cebola o segundo experimento foi mais eficiente em relação ao primeiro, pois além de mostrar tratamentos com 100% (F) e 93,75% (E) de explantes sem contaminação, o tempo necessário para a realização das assepsias também foi menor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHOJWANI, S.S. *In vitro* propagation of garlic by shoot proliferation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.16, n. 1, p.47-52, 1980.

- CARVALHO, D. de; PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. Uso de fungicida e antioxidantes em cultura *in vitro* de segmentos nodais de *Eucalyptus grandis* HILL ex MAIDEN. **Ciência e Prática**, Lavras, v.14, n.1, p.97-106, 1990.
- DUNSTAN, D.I.; SHORT, K.C. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.41, n.1, p.70-72. Oct. 1977a.
- DUNSTAN, D.I.; SHORT, K.C. In vitro studies on organogenesis and growth in *Allium cepa* tissue culture. **Acta Horticulturae**, La Plata, v.78, p.139-148, 1977b.
- DUNSTAN, D.I.; SHORT, K.C. Shoot production from the flower head of *Allium cepa* L. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.10, p.345-356, 1979.
- FRIDBORG, G. Growth and organogenesis in tissue cultures of *Allium cepa* var. *proliferum*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.25, p.436-440, 1971.
- GIZAWY, A.M.; FORD-LLOYD, B.V. An *in vitro* method for the conservation and storage of garlic (*Allium sativum*) germplasm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.9, n.1, p.147-150, Jan. 1987.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990, p.99-169.
- HAVRANEK, P.; NOVAK, J.F. The bud formation in the callus cultures of *Allium sativum* L. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, v.68, p.308-318, 1973.
- HUSSEY, G. *In vitro* propagation of the onion *Allium cepa* by axillary and adventitious shoot proliferation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.9, p.227-236, 1978.
- HUSSEY, G.; FALAVIGNA, A. Origin and production of *in vitro* adventitious shoots in the onion, *Allium cepa* L. **Journal of Experimental Botany**, Alexandria, v.31, n.125, p.1675-1686, Dec., 1980.
- LEIFERT, C.; PRYCE, S.; LUMSDEN, P.J.; WAITES, W.M. Effects of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.30, n.3, p.171-179, Sep. 1992.
- LU, C.C.; CURRAH, L.; PEFFLEY, E.B. Somatic embryogenesis and plant regeneration in diploid *Allium fistulosum* × *A. cepa* F₁ hybrid onions. **Plant Cell Reports**, New York, v.7, n.8, p.696-700, Mar. 1989.
- MOHAMED-YASSEEN, Y.; SPLITTSTOESSER, W.E.; LITZ, R.E. *In vitro* bulb formation and plant recovery from onion inflorescences. **HortScience**, Alexandria, v.28, n.10, p.1052, 1993.
- MOHAMED-YASSEEN, Y.; SPLITTSTOESSER, W.E.; LITZ, R.E. *In vitro* shoot proliferation of sets from garlic and shallot. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.36, n.2, p.243-247, Feb. 1994.

- NOME, F.; ABRIL, A.; RACCA, R. Obtención de plantas de ajo (*Allium sativum* L.) libres de virus mediante el cultivo de meristemas apicales. *Phyton*, v.41, p.139-151, 1981.
- NOVAK, F.J.; HAVEL, L. Shoot production from *in vitro* cultured flower heads of *Allium porrum* L. *Biology Plant*, Praha, v.23, p.266-269, 1981.
- NOVAK, F.J.; HAVEL, L.; DOLEZEL, J. Onion, garlic and leek (*Allium* species). In: BAJAH, V.P.S. (Ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Berlín, 1986. v.2, Crop I, p.387-408.
- PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants. Netherlands, Martinus Nijhoff Publishers, 1987, 344 p.
- PHILLIPS, R.; ARNOTT, S.M.; KAPLAN, S.E. Antibiotics in plant tissue culture: rifampicin effectively controls bacterial contamination without effecting the growth of short-term explant cultures of *Helianthus tuberosus*. *Plant Science Letters*, Limerick, v.21, p.235-240, 1981.
- PHYTASOURCE. St. Louis: *Sigma Plant Culture*, 1994. v.5, n.1, 8p.
- TRICOLI, D.M.; MAYNARD, C.A.; DREW, A.P. Tissue culture of propagation of mature trees of *Prunus serotina* Ehrh. I. Establishment, multiplication and rooting *in vitro*. *Forestry Science*, Washington, v. 31, n.1, p.201-208, 1985.

3 PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CEBOLA (*Allium cepa* L.) A PARTIR DE TECIDOS DE BULBOS

RESUMO

Visando a micropropagação *in vitro* de plantas de cebola, tecidos de bulbos foram utilizados para a retirada dos explantes. Para determinar a melhor taxa de multiplicação, explantes de disco basal de bulbos da cultivar Pira Ouro foram inoculados em meio MS com BAP (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L) x ANA (0,0; 0,5 e 1,0 mg/L). O desenvolvimento de brotações foi observado em todas as combinações de BAP e ANA. A maior porcentagem de regeneração (60%) foi verificada em BAP (2,0 mg/L) x ANA (1,0 mg/L) e maior número de brotos por explante (5,15) foi para BAP (4,0 mg/L) x ANA (1,0 mg/L), mostrando uma taxa de multiplicação de 20,60 brotos por bulbo.

Num outro experimento, gemas caulinares extraídas de bulbos das cultivares Pira Ouro e Baia Piriforme foram inoculadas em meio MS suplementado com BAP (1,0 e 2,0 mg/L) x IBA (0,0; 0,5 e 1,0 mg/L). A maior taxa de multiplicação observada para 'Pira Ouro' foi de 6,5 brotos por explantes originados de BAP (2,0 mg/L) x AIB (0,5 mg/L) e de 'Baia Piriforme' foi de 2,6 brotos para explantes originados de BAP (1,0 mg/L) x ANA (1,0 mg/L).

3.1 REFERENCIAL TEÓRICO

A presença do mecanismo de macho-esterilidade presente na cebola, assim como em outras espécies vegetais, tem facilitado alguns programas de melhoramento genético, principalmente com relação à produção de sementes híbridas.

Uma das grandes barreiras encontradas na cultura da cebola com relação à produção de híbridos é a manutenção das linhas macho-estéreis por vias convencionais, o que é feito através de linhagens mantenedoras macho-férteis, sendo este um processo muito demorado, além de exigir mão-de-obra especializada, onerando assim o processo (Pike, 1986).

Através das técnicas de cultura de tecidos, a manutenção e multiplicação rápida de plantas macho-estéreis, bem como de outras linhas melhoradas, poderiam ser altamente vantajosas para um programa de melhoramento genético, pois não haveria necessidade da criação de linhas mantenedoras.

Uma das aplicações mais concretas e de maior destaque dentro da cultura de tecidos é indiscutivelmente a propagação vegetativa, também denominada de micropropagação. O grande destaque atribuído a micropropagação se deve principalmente à descoberta da citocinina (cinetina) e a demonstração de sua alta atividade na morfogênese de partes aéreas (Skoog e Miller, 1957).

A primeira aplicação comercial da micropropagação foi realizada por Morel (1960) ao multiplicar orquídeas através da cultura de ápices caulinares seguida da regeneração de protocormos, estruturas que se diferenciam dando origem ao embrião.

O desenvolvimento de plantas inteiras a partir de meristemas apicais (sem qualquer primórdio foliar), inoculados em meio contendo sais minerais, vitaminas e enriquecido com fitorreguladores, foi obtido mais tarde por Smith e Murashige (1970).

A atividade comercial da micropropagação concentra-se principalmente na limpeza clonal e multiplicação de espécies ornamentais, seguido das lenhosas, com destaque para a multiplicação de porta-enxertos de fruteiras de clima temperado e árvores elites de essências florestais (como o eucalipto). Dentre as hortaliças, a micropropagação vem sendo feita há mais tempo principalmente para a batata e o morango, e continuam até hoje (Torres e Caldas, 1990).

O sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de um grande número de fatores como material vegetal, a manipulação, meios de cultura, condições de incubação, enraizamento e aclimação.

Dentre os principais componentes dos meios de cultura, destacam-se os fitorreguladores, os quais tem como objetivo principal suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios presente nos explantes. Estes são responsáveis por certas respostas como crescimento, alongamento ou multiplicação da parte aérea, as quais dependem também do estado fisiológico do explante (Torres e Caldas, 1990).

O uso de fitorreguladores do grupo das citocininas induz brotações *in vitro*, sendo muitas vezes favorável e/ou até mesmo necessário para a micropropagação. A determinação do tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam no processo de multiplicação *in vitro*. Uma das citocininas mais potente para promover a proliferação de parte aérea, economicamente mais barata e mais estável do que as naturais, é o BAP (Hasegawa, 1980; Hu e Wang, 1983), seguida da cinetina e 2-ip.

As concentrações de citocinina utilizadas na multiplicação estão em geral entre 0,1 a 5,0 mg/L (Torres e Caldas, 1990). O uso de citocininas em concentrações muito elevadas pode ser tóxico, comprometendo o bom desenvolvimento das culturas *in vitro*.

Em culturas de *Castanea mollissima*, o excesso de BAP inibiu a brotação de gemas, reduziu drasticamente o número de partes aéreas por explante, como também

promoveu a formação de calos (Qi-Guang et al., 1986). O BAP também afeta a vitrificação (hiperhidrificação) interagindo com a concentração de agar no meio de cultura (Debergh, 1983; Pasqualetto, Zimmerman e Fordham, 1986).

Em cebola, o uso de BAP em concentrações acima de 6,0 mg/L e de cinetina acima de 10,0 mg/L, foi tóxico, e consequentemente reduziu o número de brotos regenerados por explantes secundários (Kahane, Rancillac e de la Serve, 1992).

O uso de fitorreguladores do grupo das auxinas nem sempre se faz necessário no meio de multiplicação (Quorin e Leproive, 1977), embora muitas vezes estas sejam utilizadas com o objetivo de anular o efeito inibitório que as citocininas têm sobre o alongamento das culturas (Hu e Wang, 1983). O ANA é uma das auxinas mais utilizadas, seguido de AIB e AIA (Hu e Wang, 1983). Estes normalmente são adicionados, ao meio de cultura, em concentrações mais baixas, exceto para o AIA que por ser menos estável devido à fotooxidação e a ação da AIA oxidase presente nos tecidos, pode ser utilizado em concentrações mais elevadas (Torres e Caldas, 1990).

É sabido que o gênero *Allium* apresenta alta capacidade para formação de brotos adventícios, assim como outros membros da família Liliaceae, como por exemplo o *Lilium* (Hackett, 1969) e *Ornithogalum* (Hussey, 1976).

Para cebola, alguns trabalhos já foram realizados visando a micropropagação como cultura de meristemas, brotos, partes de órgãos (segmento de disco basal de bulbos, inflorescências, botões florais), calos e embriões (Novak, Havel e Dolezel, 1986).

3.1.1 TÚNICAS UNIDAS POR SEGMENTO BASAL

Estudos visando a micropropagação *in vitro* de plantas macho-estéreis de cebola tiveram início na década de 1970. Altas taxas de proliferação de brotos foram obtidas

por Hussey (1978), Hussey e Falavigna (1980) e por Fujieda, Matsuoka e Fujita (1979), cultivando segmentos de bulbo com túnicas unidas na base por pequenos segmentos de tecido basal das cultivares Senshyu e similar, Yellow Express e a linha híbrida W3.

A regeneração de brotos foi obtida diretamente de tecido basal, sem passar pela formação de calos (Fujieda, Matsuoka e Fujita, 1979). Esses brotos apresentaram alta estabilidade genética pois, segundo investigações citológicas realizadas por Hussey e Falavigna (1980), foram observados somente número diplóide de cromossomos.

A formação de brotos adventícios foi extremamente dependente da cinetina e ANA quando se utilizou explantes contendo túnicas unidas na base por segmento de disco basal e o meio de cultura de Murashige e Skoog, 1962 (Fujieda, Matsuoka e Fujita, 1979). Segundo esses autores as citocininas são de fundamental importância para o desenvolvimento de brotos em cebola. No entanto, a exigência em auxina é extremamente dependente da cultivar utilizada (Hussey e Falavigna, 1980).

Os brotos axilares desenvolvidos em explante de base de túnica tem sua origem nas axilas das túnicas mais novas, próximo ao broto apical (principal) e observações preliminares tem indicado que sua formação é similar à de tecidos que dão origem a brotos adventícios (Hussey e Falavigna, 1980; Kahane, Rancillac e de la Serve, 1992).

Assim como em outros gêneros de monocotiledôneas que formam bulbos, a cebola apresenta limitada capacidade para formar brotos axilares verdadeiros. Em toda superfície abaxial (costas) de certas folhas e túnicas existe um potencial para formar meristemas de brotos adventícios, os quais normalmente são inibidos pela dominância apical (Hussey e Falavigna, 1980).

Os fatores ambientais como temperatura e luminosidade também influenciam no processo de desenvolvimento da morfogênese. Plântulas desenvolveram mais rapidamente em temperatura de 25°C quando comparadas com aquelas mantidas em temperaturas de 15 a

20°C, porém apresentaram coloração mais clara (Hussey, 1978). A indução de brotos foi maior em fotoperíodo de 16 horas de luz em relação àquelas mantidas em fotoperíodo de 8 horas de luz (Hussey e Falavigna, 1980).

Também foi observado que brotos propagados na presença de citocinina BAP apresentaram um desenvolvimento normal do sistema radicular, podendo ser transplantados, com sucesso, para o substrato (Hussey, 1978).

Explantos excisados de bulbos em estágio pós-dormente se mostraram mais ativos na formação de brotos adventícios, quando comparados com aqueles excisados em estágio dormente, e produziram cerca de 10 brotos por explante num período de 30 dias de cultura (Fujieda, Matsuoka e Fujita, 1979).

3.1.2 BROTOS E MERISTEMAS

A técnica de cultura de meristema geralmente é utilizada para a erradicação de vírus e micropropagação de plantas. Este processo tem apresentado a grande vantagem de manter a estabilidade genética, e conseqüentemente, poderá ser utilizado para a conservação de germoplasma *in vitro*.

Segundo Jones e Mann (1963), os meristemas das espécies do gênero *Allium* estão situados no centro de um caule achatado, sobre sua superfície superior, e o broto apical está localizado dentro de uma folha tubular jovem.

A cultura de meristemas tem sido muito aplicada na cultura do alho, visando principalmente a erradicação de viroses, onde os meristemas acompanhados de dois primórdios foliares tem se mostrado altamente eficientes quanto à obtenção de material sadio. Segundo Novak, Havel e Dolezel (1985) esta técnica tem sido estudada mais extensivamente para o alho quando comparada com a cultura da cebola.

Hussey (1978) cultivando brotos de cebola do cultivar Senshyu e similar com 10 a 15 mm de altura e com 1 mm de tecido de disco basal, em meio MS suplementado com BAP ou 2-ip, obteve plântulas vigorosas. Esses brotos quando seccionados no sentido longitudinal e cultivados em meio suplementado com BAP (0,5 a 4,0 mg/L) mostraram altas taxas de proliferação de plântulas após 4 a 6 semanas de cultivo.

Segundo Novak, Havel e Dolezel (1985), não se observou multiplicação de brotos quando se inoculou explantes de 0,5 mm, excisados de plantas no estágio de 2 a 3 folhas, em meio BDS (Dunstan e Short, 1977) suplementado com BAP e ANA isolados ou em combinação, sendo verificado apenas o desenvolvimento de um único broto. Estes resultados discordam dos obtidos por Hussey (1978), os quais podem ser devidos a diferentes concentrações de hormônios endógenos presente no explante, ao tamanho do explante ou talvez pelos diferentes genótipos utilizados no experimento.

Nagy (1984), trabalhando com uma linha macho-estéril citoplasmática e dois cultivares: Makoi e Aroma, obteve uma taxa de multiplicação que variou de 5 a 20 brotações por meristemas, quando estes foram inoculados inicialmente em meio MS(1962) suplementado com 1 mg/L de AIB e BA, e após 20 dias transferidos para o mesmo meio, porém suplementado com 1 mg/L de AIB e 0,1mg/L de BA.

O uso de BAP combinados com AIA e AIB, tem sido descritos para *Capsicum annum* com a utilização do explante cotilédonar, onde após a formação de pequenos calos, foram obtidas brotações seguidas de enraizamento (Agrawal, Chandra e Kothart, 1988).

Meyer e Staden (1991) obtiveram máximo crescimento de brotações e raízes, sem a formação de calos de *Aloe barbadensis* quando explantes de brotos foram inoculados em meio MS, suplementado com 5 mM de AIB.

3.2 MICROPROPAGAÇÃO DE CEBOLA A PARTIR DE SEGMENTOS BASAIS DE BULBOS

3.2.1 OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo estudar o efeito da combinação da citocinina (BAP) com a auxina (ANA), na taxa de multiplicação *in vitro*, de plântulas de cebola, a partir de segmentos basais de bulbos.

3.2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados bulbos da cultivar Pira Ouro com aproximadamente 110 dias de pós-colheita e com diâmetros variando entre 30 a 40 mm. Estes foram obtidos de sementes plantadas em casa-de-vegetação, do Departamento de Agricultura, ESAL, em julho de 1993 e colhidos em final de novembro do mesmo ano.

Os bulbos utilizados para a retirada dos explantes foram submetidos inicialmente aos seguintes passos: retirada das cascas, corte das raízes seguido de lavagem em água corrente e detergente por 30 minutos. Após esses passos os bulbos foram seccionados a ± 20 mm de altura da base, procedendo em seguida o corte das túnicas nas laterais da superfície pré-cortada, a fim de eliminar os tecidos de reserva.

Os segmentos foram submetidos em seguida ao seguinte tratamento previamente definido para a desinfestação: imersão em solução de detergente comercial por 30 minutos, imersão em solução Benomyl (2 g/L) por 2-3 horas, imersão em álcool 70% por 1 minuto, imersão em água sanitária (2% NaClO) com pH 6,0 por 1 hora e 30 minutos, lavagem por 3 vezes com água bidestilada e autoclavada. Toda a vidraria e instrumentos utilizados,

como pinças e bisturis, também foram previamente autoclavados. O processo todo utilizado para a desinfestação foi realizado em câmara de fluxo laminar horizontal.

Após esta etapa os segmentos tiveram as camadas externas (parte basal e túnicas) seccionados, a fim de eliminar os tecidos danificados pela desinfestação, mantendo-se apenas um segmento de aproximadamente 10 mm². Posteriormente, este segmento foi seccionado por quatro vezes, no sentido longitudinal, eliminando-se a gema principal, resultando em quatro explantes.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 13,0 ml de meio previamente esterilizado em autoclave horizontal a 120°C e 1 atmosfera de pressão, por 20 minutos. Utilizou-se o meio de MS(1962), modificado pela adição da metade da concentração das vitaminas e suplementado com a citocinina BAP nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L (sendo que a dose 0,0 mg/L de BAP não foi utilizada porque alguns trabalhos preliminares não mostraram respostas na ausência de citocinina), em combinação com a auxina ANA nas concentrações de 0,0; 0,5 e 1,0 mg/L, no esquema fatorial, totalizando 12 tratamentos de meio de cultura. Ao meio foi adicionado agar (7,0 g/L), sendo o pH ajustado para 5,9.

Após a inoculação dos explantes (1 explante/tubo), o experimento foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro, temperatura de 25 ± 2°C e aproximadamente 1.500 lux de luminosidade.

O delineamento experimental utilizado foi um split-plot com parcelas divididas no tempo, com 5 repetições, sendo as parcelas constituídas por 4 plântulas (tubos). Decorridos 30 dias após a instalação do experimento, foram realizadas 3 avaliações com 30, 45 e 60 dias, avaliando-se a porcentagem de regeneração e número médio de brotos por explante.

3.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de regeneração e o número de brotos por explante (Tabela 3) foram influenciados significativamente pelas doses de ANA ($P < 0,05$) e épocas de avaliação ($P < 0,01$). No entanto, o alto valor observado para o C.V. (95,02), seja devido à grande variação na porcentagem de regeneração de explantes ocorridas dentro das parcelas de um mesmo tratamento, causadas provavelmente pelo uso de poucos bulbos apresentando diferentes diâmetros.

TABELA 3. Resumo das análises de variância para porcentagem de regeneração e número médio de brotos por explante da cultivar Pira Ouro.

F.V.	G.L.	Quadrados Médios	
		Porcentagem Regeneração ⁽¹⁾	Número Médio Brotos/Explante ⁽²⁾
Bloco	4	2.503,1252*	3,3536**
BAP	3	277,9167	0,4543
ANA	2	3.446,2500*	2,1954*
BAP x ANA	6	417,9167	0,5309
Resíduo (a)	44	881,7614	0,5505
Avaliação	2	2.126,2503**	2,3442**
BAP x Aval.	6	127,9167	0,0237
ANA x Aval.	4	82,5000	0,0248
BAP x ANA x Aval.	12	99,1667	0,0320
Resíduo (b)	96	80,3125	0,2095
C.V. (a) (%)		95,02	54,227
C.V. (b) (%)		28,68	16,858

(1)- Dados transformados para Arc Sen Raiz ($X/100$);

(2)- Dados transformados para Raiz ($X + 0,5$);

* - Significativo ao nível de 5% pelo teste F;

** - Significativo ao nível de 1% pelo teste F.

A cultivar Pira Ouro mostrou ser exigente em auxina (ANA), pois as médias observadas para porcentagem de regeneração e número médio de brotos por explante na dose 1,0 mg/L foram bem superiores às observadas para as doses 0,0 e 0,5 mg/L de ANA, as quais apresentaram comportamento semelhante (Figura1).

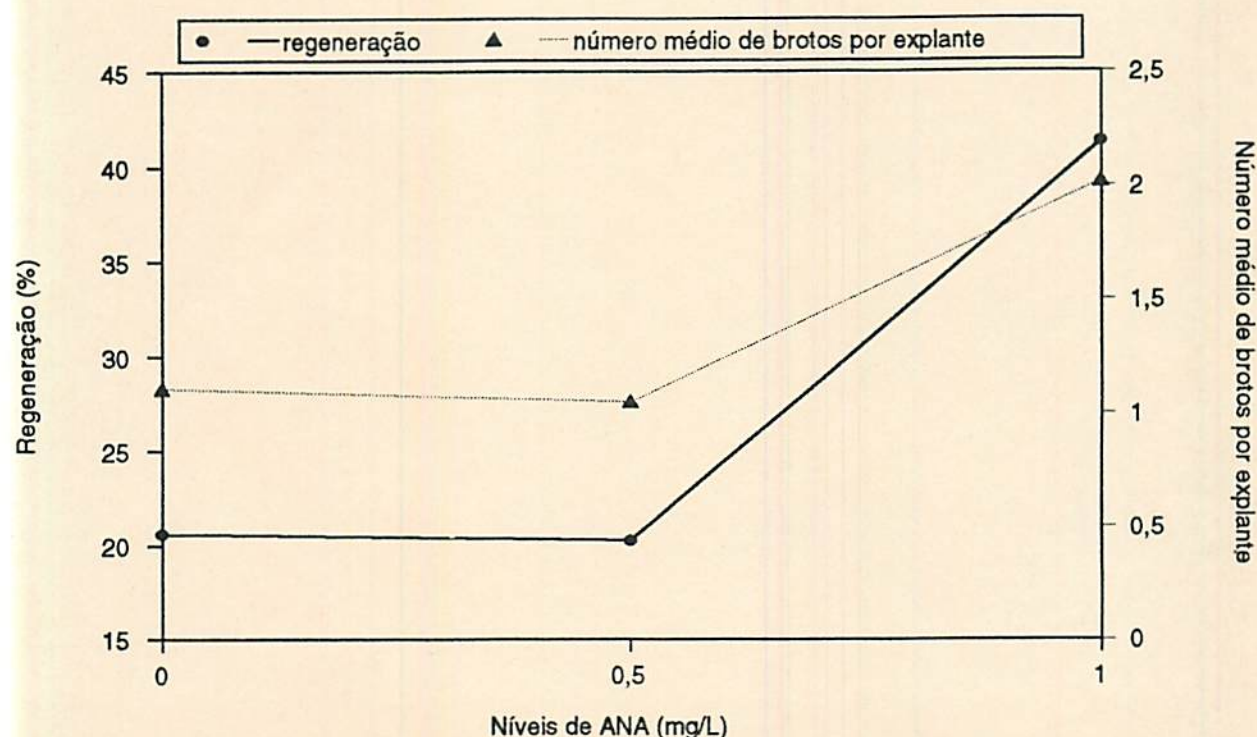


FIGURA 1. Efeito das concentrações de ANA sobre a porcentagem de regeneração e número médio de brotos por explante de tecido basal de bulbo da cultivar Pira Ouro, durante as avaliações.

A concentração de 1,0 mg/L de ANA elevou a porcentagem de regeneração para mais de 40%, ou seja, à medida que duplicou a concentração de ANA, duplicou também a porcentagem de regeneração, o mesmo sendo observado para número médio de brotos por explante.

Para as doses de BAP utilizadas (0,5 a 4,0 mg/L) não se verificou diferenças significativas entre as médias, ou seja, tanto para a porcentagem de regeneração como para o número médio de brotos por explantes as médias foram iguais (Figura 2).

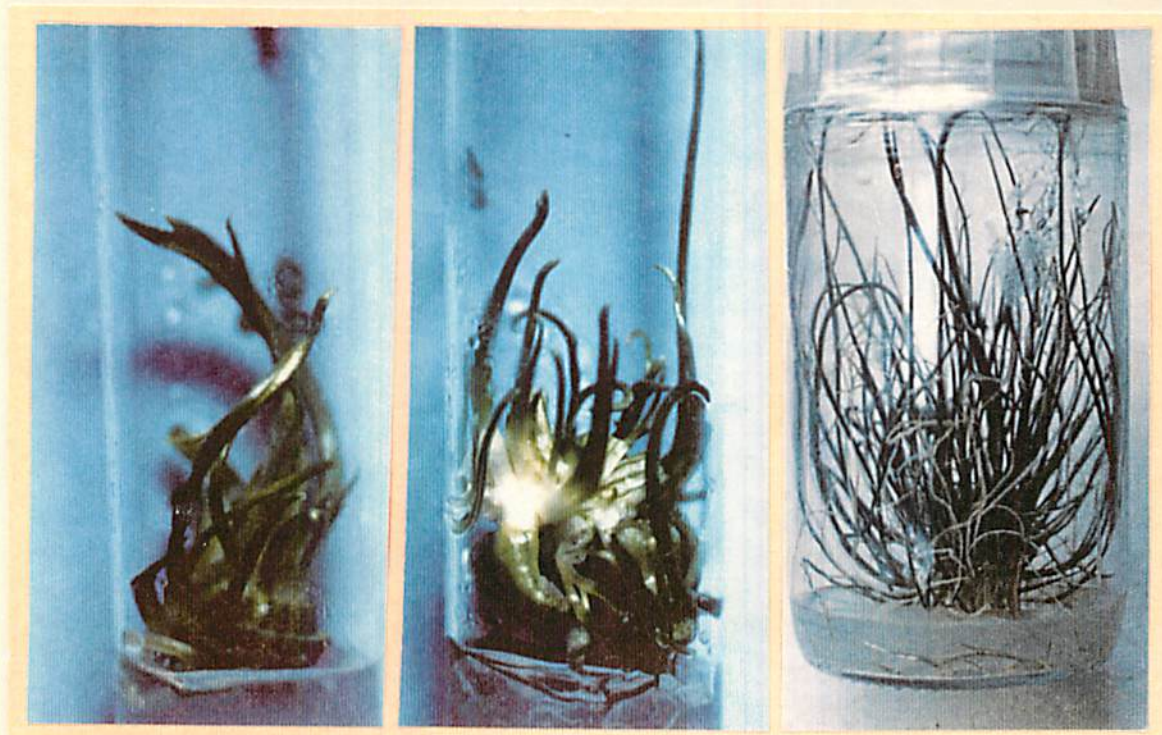


FIGURA 2. Regeneração de explantes de tecido basal da cultivar Pira Ouro em meio com BAP (0,5 e 4,0 mg/L) e plântulas desenvolvidas aos 60 dias de avaliação.

Um aumento significativo na porcentagem de regeneração (Figura 3) foi observado no período de 30 a 45 dias, sendo que nas avaliações realizadas aos 30 dias, a cultivar não refletiu o seu potencial morfogênético para regeneração necessitando portanto de um período mais prolongado para a obtenção de melhores respostas. A maior porcentagem de regeneração e maior número de brotos por explante foram observados aos 60 dias, ou seja, no final das avaliações, sendo os aumentos ocorridos nos dois parâmetros explicados pela equação linear.

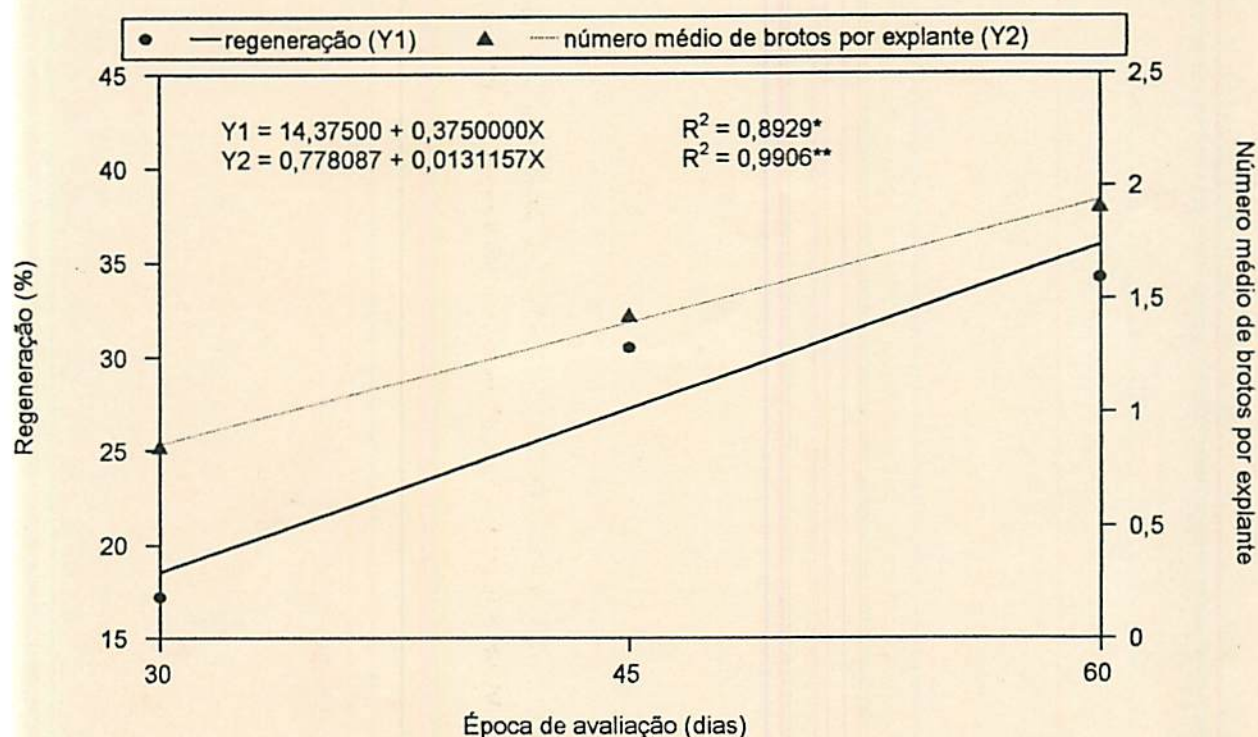


FIGURA 3. Porcentagem de regeneração e número médio de brotos por explantes no decorrer das avaliações da cultivar Pira Ouro.

Nas avaliações realizadas aos 60 dias (Tabela 4), apenas o número médio de brotos por explante mostrou diferença significativa entre as médias para as doses de ANA ($P < 0,05$). Houve uma tendência do maior número de brotos ser observado na dose mais elevada de ANA (1,0 mg/L) (Figura 4), discordando portanto dos resultados obtidos por Hussey e Falavigna (1980) com a cultivar Senshyu e por Fujieda, Matsuoka e Fujita (1979), onde doses crescentes de ANA mostraram efeito inibitório, reduzindo o número de brotos por bulbos, sendo os melhores resultados observados em ausência de ANA. Para as doses de BAP (0,5 - 4,0 mg/L) não se observou diferenças significativas, discordando também dos resultados observados por Hussey e Falavigna (1980), onde as cultivares Senshyu e Yellow Express apresentaram maior número de brotos na concentração de 4,0 mg/L.

TABELA 4. Resumo das análises de variância para porcentagem de regeneração e número médio de brotos por explantes a partir de bulbos da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 60 dias.

F.V.	G.L.	Quadrados Médios	
		Porcentagem Regeneração ⁽¹⁾	Número Médio Brotos/Explante ⁽²⁾
Bloco	4	1.280,6250*	1,5303*
BAP	3	103,7500	0,1412
ANA	2	971,2500	0,9304*
BAP x ANA	6	246,2500	0,2596
Resíduo	44	362,2159	0,3113
C.V. (%)		53,236	35,667

(1)- Dados transformados para Arc Sen Raiz ($X/100$);

(2)- Dados transformados para Raiz ($X + 0,5$);

* - Significativo ao nível de 5% pelo teste F.

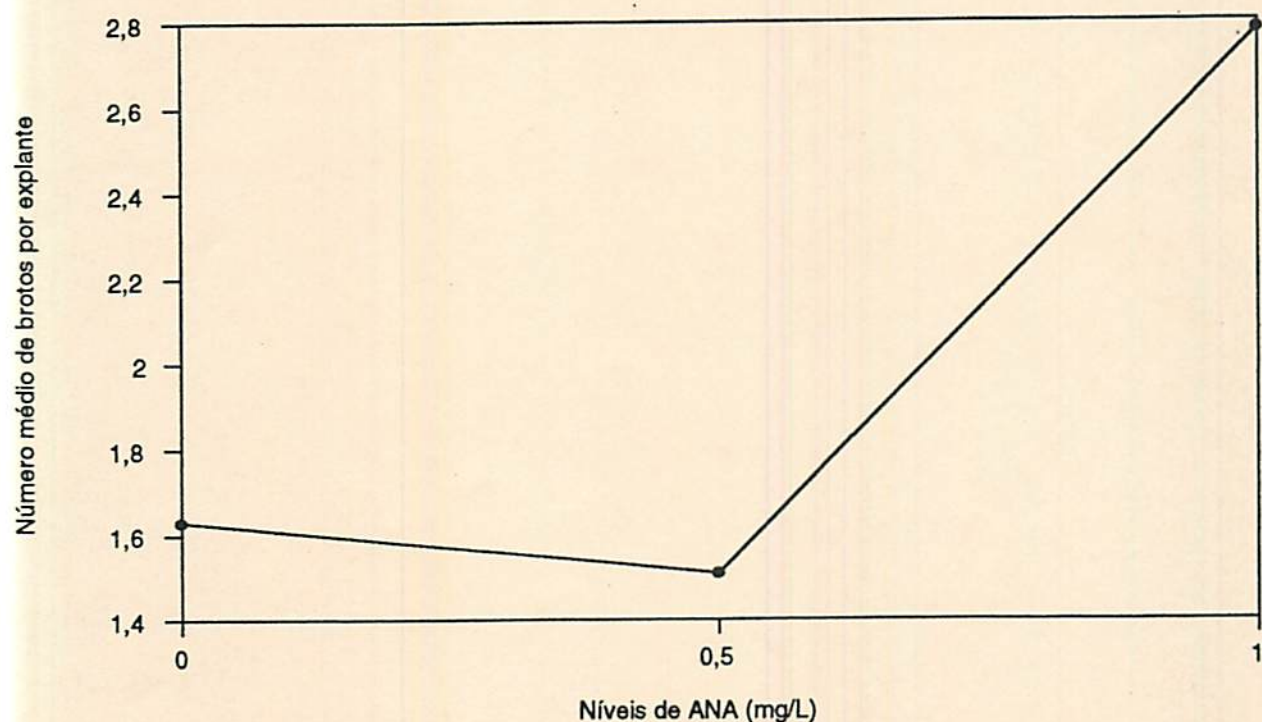


FIGURA 4. Efeito das concentrações de ANA sobre o número médio de brotos por explante de tecido basal de bulbo da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 60 dias.

Todas as combinações de BAP x ANA utilizadas mostraram capacidade de regeneração, porém em diferentes frequências. A porcentagem de explantes com regeneração variou de 25% para BAP (1,0 mg/L) x ANA (0,5 mg/L) a 60% para BAP (2,0 mg/L) x ANA (1,0 mg/L) (Tabela 5). Essa baixa porcentagem de regeneração de explantes observada nos tratamentos pode estar associada com a heterogeneidade dos bulbos, fator este não eliminado no início do experimento devido à escassez do material vegetal.

TABELA 5. Porcentagem de regeneração e número médio de brotos por bulbos da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 60 dias.

BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	Porcentagem de Explantes Regenerados	Número de brotos por		Porcentagem de plântulas	
			explante	bulbo	Normais	Hiperhidrificadas
0,5	0	45	2,45	9,80	85,71	14,29
0,5	0,5	30	1,40	5,60	100,00	0,00
0,5	1,0	30	1,90	7,60	100,00	0,00
1,0	0	30	1,40	5,60	100,00	0,00
1,0	0,5	25	2,05	8,20	100,00	0,00
1,0	1,0	55	3,45	13,60	84,06	15,94
2,0	0	35	2,35	9,50	85,11	14,89
2,0	0,5	30	1,50	6,00	66,67	33,33
2,0	1,0	60	2,35	9,40	55,32	44,68
4,0	0	30	2,65	10,60	100,00	0,00
4,0	0,5	40	2,20	8,80	93,18	6,82
4,0	1,0	50	5,15	20,60	85,44	14,56

4 explantes = 1 bulbo

> Taxa de multiplicação (4,0 BAP x 1,0 ANA) = $5,15 \times 4 = 20,60$

< Taxa de multiplicação (0,5 BAP x 0,5 ANA e 1,0 BAP x 0,0 ANA) = $1,40 \times 4 = 5,60$

As maiores taxas de multiplicação foram observadas para o tratamento com 4,0 mg/L de BAP x 1,0 mg/L de ANA, mostrando um número médio de brotos por bulbo de 20,6, seguido de 1,0 mg/L de BAP x 1,0 mg/L de ANA com 13,6 (Tabela 5), num período de 60 dias.

A ocorrência de plântulas hiperhidrificadas também foi observada, e provavelmente foi causada pelo uso da citocinina BAP no meio de multiplicação. A maior porcentagem de plântulas hiperhidrificadas (44,68%) foi observada em BAP (2,0 mg/L) x ANA (1,0 mg/L). A transferência dessas plântulas de cebola para meio MS sem fitorreguladores, por

um ou dois subcultivos (30 dias cada) foi suficiente para obtenção de plântulas com aspecto normal, ou seja, não apresentando os sintomas da hiperhidrificação (dados não apresentados). Leshem, Wekwer e Shavel (1988), trabalhando com crisântemo e melão também constataram a presença de plântulas hiperhidrificadas na presença da citocinina BAP.

3.2.4 CONCLUSÕES

O desenvolvimento das brotações foi observado em todas as combinações de BAP x ANA, no entanto a melhor combinação foi de 4,0 mg/L de BAP x 1,0 mg/L de ANA onde se obsevou 50% dos explantes com regeneração e maior número de brotos por explantes (5,15), mostrando uma taxa de multiplicação de 20,6 brotos por bulbo, num período de 60 dias.

3.3 MICROPROPAGAÇÃO A PARTIR DE GEMAS CAULINARES

3.3.1 OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo estudar o efeito do BAP x AIB na multiplicação, a partir de explantes de gemas caulinares extraídas de bulbos.

3.3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados como explantes, gemas com aproximadamente 2,0 a 3,0 mm de altura x 1,0 mm de base, extraídas do pseudo-caule de bulbos em fase final de dormência ($\pm$ 3,5 meses) das cultivares Pira Ouro e Baia Piriforme.

Para a desinfestação dos explantes utilizou-se o mesmo tratamento descrito anteriormente para segmentos basais de bulbos. Utilizou-se o meio de cultura MS (1962), suplementado com BAP (1,0 e 2,0 mg/L) e AIB (0,0; 0,5 e 1,0 mg/L), em combinações fatoriais, acrescido de sacarose (30 g/L) e agar (7,0 g/L), após o pH ter sido aferido para 5,9.

Após a adição de 13,0 ml do meio de cultura em tubos de ensaio, estes foram fechados com tampas plásticas e autoclavados a 120°C e 1 atmosfera de pressão, durante 20 minutos e posteriormente inoculou-se uma gema por tubo.

Decorridos 30 dias do início do experimento, foram realizados três subcultivos, em intervalos de 30 dias, para o mesmo meio, porém suplementado com BAP (0,1 mg/L) x AIB (1,0 mg/L), visando avaliar a influência dos subcultivos na taxa de multiplicação.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com parcelas subdivididas no tempo, 4 repetições por tratamento e parcelas representadas por 4 plântulas. As avaliações foram realizadas em intervalos de 30 dias, onde foram avaliados a porcentagem de sobrevivência das plântulas desenvolvidas a partir de gemas e a taxa de multiplicação calculada pelo número de plântulas obtidas após 30 dias de cada subcultivo, dividido pelo número de plântulas inoculadas no primeiro subcultivo.

3.3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de diferenciação das gemas foi observado em todos os tratamentos, tendo diferentes graus de frequência de regeneração.

Pela Figura 5, verifica-se que para a cultivar Pira Ouro, a maior frequência de regeneração foi de 55%, observada em BAP (2,0 mg/L) x AIB (0,0) e para a cultivar Baia Piriforme foi de 50% para BAP (1,0 mg/L) x AIB (1,0 mg/L). A média dos tratamentos mostrou uma tendência maior de regeneração para a cultivar Baia Piriforme (43%) do que para Pira

[REDACTED]

Ouro (26%). Os resultados estão mostrando que o genótipo é um dos fatores muito importante no processo de diferenciação *in vitro*. As freqüências de regeneração de gemas caulinares que variaram de 10 a 55% para Pira Ouro e 35 a 50% para Baia Piriforme provavelmente foram devido às falhas ocorridas na extração das mesmas como injúria do meristema e também à incidência de fungos ocorrida na fase inicial, levando à grandes perdas de explantes dentro dos tratamentos. Nas avaliações realizadas aos 30 dias, não se observou nenhuma regeneração de brotações adventícias dentro dos tratamentos mostrando que uma gema se diferenciou em apenas uma plântula.

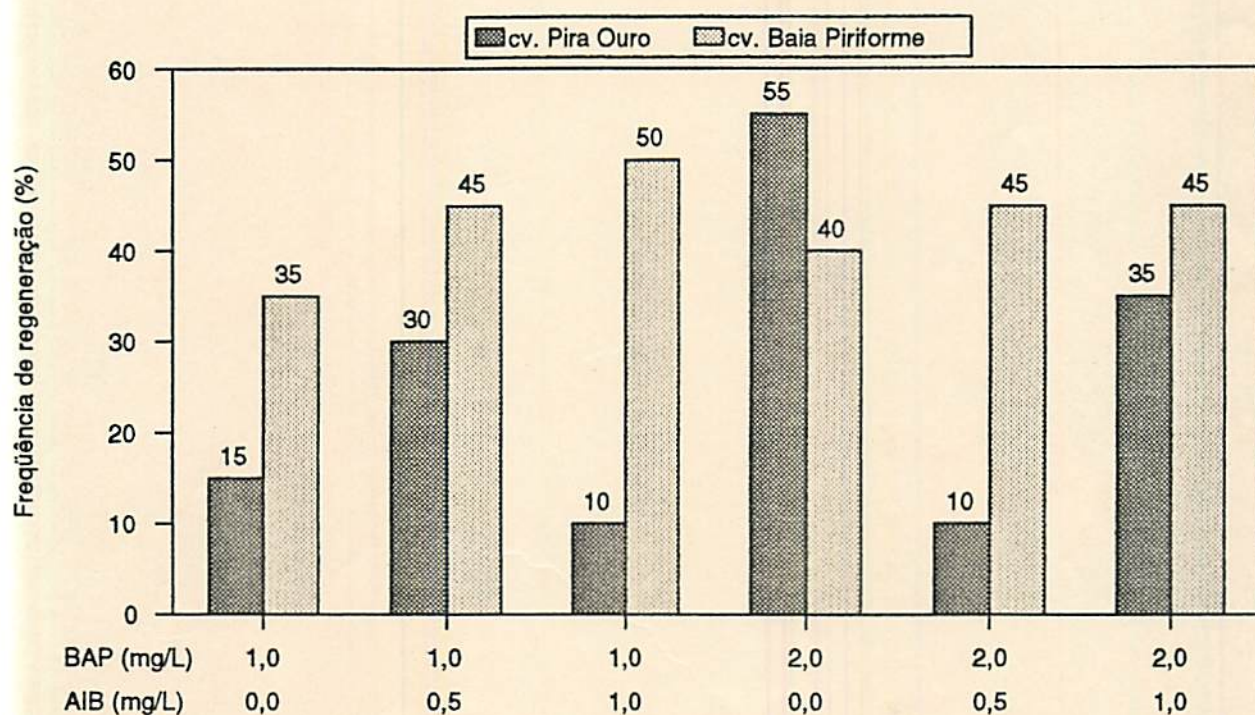


FIGURA 5. Freqüência de regeneração das plântulas provenientes de gemas caulinares das cultivares Pira Ouro e Baia Piriforme em meio MS com diferentes combinações de BAP x AIB. Avaliação aos 30 dias.

Observa-se na Figura 6A, que 30 dias após o primeiro subcultivo para meio MS suplementado com BAP (0,1 mg/L) x AIB (1,0 mg/L) a cultivar Pira Ouro apresentou taxas de

multiplicação (T.M.) variando de 1,3 para plântulas originadas no tratamento BAP (1,0 mg/L) x AIB (0,0) a 6,5 para as originadas no tratamento BAP (2,0 mg/L) x AIB (0,5 mg/L), enquanto na cultivar Baia Piriforme (Figura 6B) a regeneração de brotações adventícias foi menor em relação à cultivar Pira Ouro, sendo que a maior taxa de regeneração foi obtida para as plântulas originadas do tratamento BAP (1,0 mg/L) x AIB (1,0 mg/L) com 2,6 plântulas e a menor foi de 1,2 originadas do tratamento BAP (1,0 mg/L) x AIB (0,5 mg/L). Esses resultados foram inferiores aos obtidos por Nagy (1984), onde após 4-6 semanas em meio MS suplementado com BAP x AIB, cada plântula enraizada produziu em média entre 5-20 brotações, mostrando que o genótipo é um fator importante no processo de organogênese.

Não foi observado aumento significativo no número médio de brotações no decorrer dos subcultivos (Tabela 6). No entanto, a cultivar Pira Ouro mostrou-se superior em relação à Baia Piriforme quanto ao potencial morfogenético para regeneração de brotações discordando porém, dos resultados observados por Nagy (1984) onde nenhuma diferença em regeneração de brotações a partir de meristemas foi observada entre a linha macho-estéril citoplasmática e as cultivares Makoi e Aroma.

TABELA 6. Número médio de brotações em três subcultivos das cultivares Pira Ouro e Baia Piriforme no meio MS suplementado com BAP (0,1 mg/L) x AIB (1,0 mg/L) em intervalos de 30 dias.

Cultivares	Subcultivos	
	Pira Ouro	Baia Piriforme
1º	4,00	1,77
2º	4,12	1,77
3º	4,25	1,88

Observa-se pela Figura 6 que o tratamento de origem das plântulas (combinação inicial de BAP x AIB) influenciou no número de brotações adventícias nos três subcultivos, mesmo após ser inoculado no mesmo meio de cultura. Isto talvez seja devido ao efeito do regulador de crescimento no metabolismo na plântula ou do próprio explante primário perdendo a capacidade regenerativa. O ganho observado no número de brotações adventícias no decorrer dos subcultivos foram insignificantes, mostrando que o maior ganho foi obtido com a cultivar Pira Ouro que passou do 1º subcultivo de 5,0 brotos/explante para o 3º subcultivo com 5,6 brotos/ explante (Figura 6A), enquanto a cultivar Baia Piriforme passou de 1,5 brotos/explante do 1º subcultivo para 1,8 brotos/explante no 3º subcultivo (Figura 6B).

A habilidade de regeneração de cebola por longo tempo ainda é discutida. Hussey (1978), supôs que a taxa de regeneração seria mantida no caso de transferência para meio contendo reguladores de crescimento. Novak e Havel (1981) mencionam que tecidos de alho porró (*A. ampeloprasum*) mantiveram sua habilidade de regeneração pelo período de um ano. No entanto essa capacidade de regeneração por longo tempo não foi verificada com cebola, por Kahane (1992), onde o aumento de brotações foi verificado sómente no primeiro subcultivo para túnicas unidas por segmento basal, os quais permaneceram estáveis após dois meses (dois subcultivos), como também observado para alho porró por Dunstan e Short (1979). Phillips e Luteyn (1983) citam que a multiplicação de brotos por seis meses ou mais pode ser obtida pela substituição do ANA por picloran.

3.3.4 CONCLUSÕES

A cultivar Baia Piriforme apresentou um maior potencial de diferenciação das gemas em relação à Pira Ouro. No entanto, maior taxa de multiplicação a partir de gemas caulinares foi observada posteriormente para a cultivar Pira Ouro.

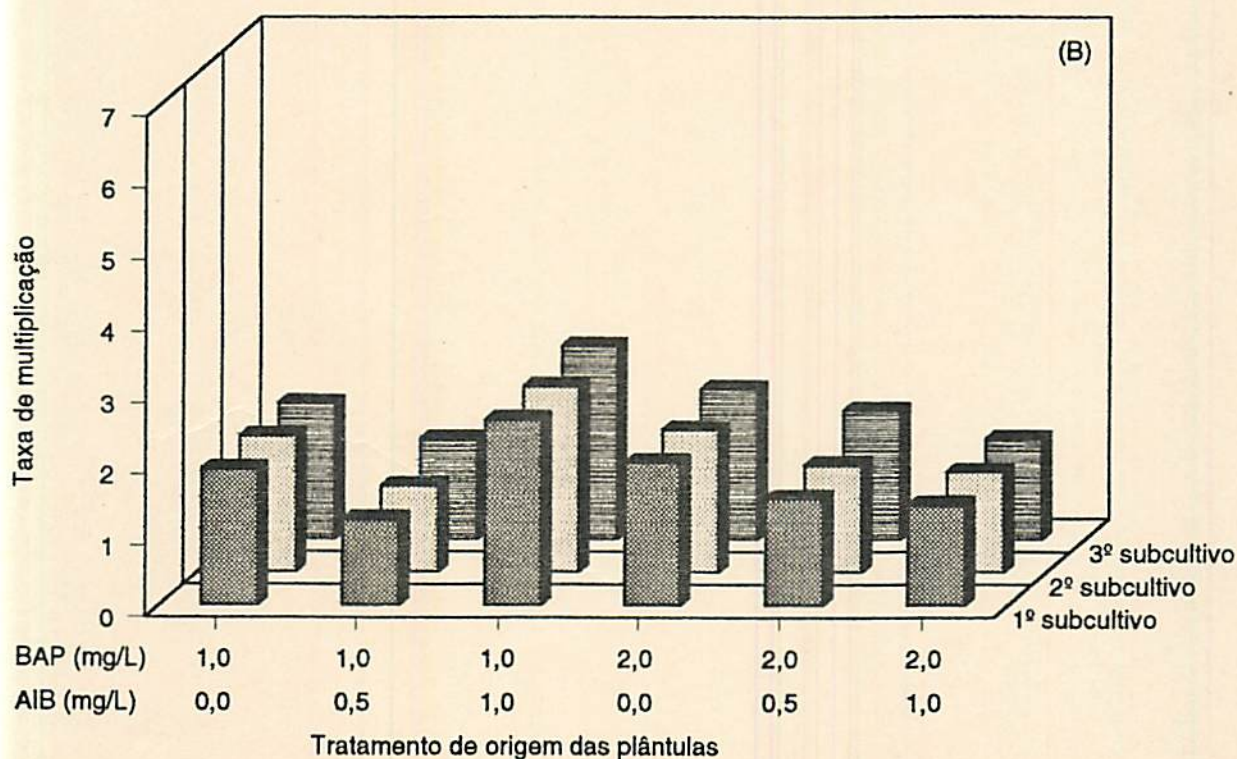
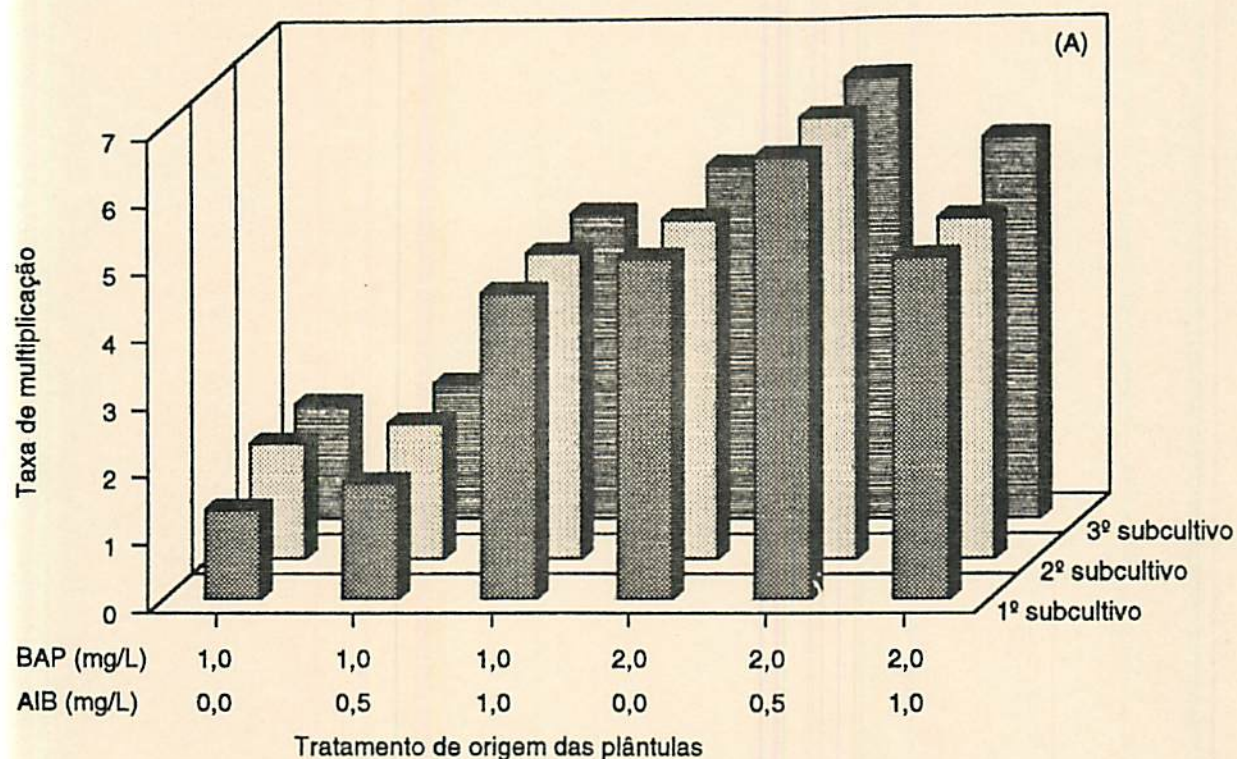


FIGURA 6. Taxas de multiplicação observadas a partir de gemas das cultivares Pira Ouro (A) e Baia Piriforme (B), inoculadas no meio MS suplementado com BAP (0,1 mg/L) e AIB (1,0 mg/L), após o 1º, 2º e 3º subcultivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, S.; CHANDRA, S.L.; KOTHART, S.L. Shoot tip culture of pepper for micropropagation. **Current Science**, New Delly, v.57, n.24, p.1347-1349, 1988.
- DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.59, n.4, p.270-276, Dec. 1983.
- DUNSTAN, D.I.; SHORT, K.C. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.41, n.1, p.70-72, Oct. 1977.
- FUJIEDA, K.; MATSUOKA, N.; FUJITA, Y. Vegetative multiplication of onion, *Allium cepa* L., through tissue culture. **Journal Japanese Society for Horticultural Science**, v.48, n.2, p.186-194, 1979.
- HACKETT, W.R. Aseptic multiplication of lily bulbils from bulb scales. **Proc. Int. Plant. Prop. Soc.**, v.19, p.105-108, 1969.
- HASEGAWA, P.M. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.105, n.2, p.216-220, Mar. 1980.
- HUSSEY, G. Plant regeneration from callus and parent tissue in *Onithogalum thyrsoides*. **Journal of Experimental Botany**, London, v.27, n.97, p.375-382, Apr. 1976.
- HUSSEY, G. In vitro propagation of the onion *Allium cepa* by axillary and adventitious shoot proliferation. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v.9, p.227-236, 1978.
- HUSSEY, G.; FALAVIGNA, F. Origin and production of in vitro adventitious shoots in the onion, *Allium cepa* L. **Journal of Experimental Botany**, London, v.31, n.125, p.1675-1686, Dec. 1980.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell culture**. v.1. Techniques for propagation and breeding. New York, Macmillan Publishing Company, p.117-227, 1983.
- JONES, H.A.; MANN, L.K. **Onions and their Allies: botany, cultivation and utilization**. London: Leonard Hill, 1963. 286p.
- KAHANE, R.; RANCILLAC, M.; DE LA SERVE, B.T. Long-term multiplication of onion (*Allium cepa* L.) by cyclic shoot regeneration in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.28, p.281-288, 1992.
- LESHEN, B.; WERKWER, E.; SHALEV, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and camation. **Annals of Botany**, New York, v.62, p.271-276, 1988.

- MEYER, H.J.; VAN STADEN, J. Rapid *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Mill. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.26, n.3, p.167-171, Sept. 1991.
- MOREL, G. Producing virus-free cymbidiums. **American Orchid Society Bulletin**, Washington, v.29, p.495-497, 1960.
- NAGY, J.J. Meridoning of onion (*Allium cepa* L.). In: NOVAK, F.J.; HAVEL, L.; DOLEZEL, J. (Eds.). **Plant Tissue and Cell Culture Application to Crop Improvement**. 1984. p.513-514.
- NOVAK, F.J.; HAVEL, L.; DOLEZEL, J. Onion, garlic and leek (*Allium Species*). In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin: Springer-Verlag, v.2. 1986.
- NOVAK, F.J.; HAVEL, L.; DOLEZEL, J. *In vitro* techniques and plant improvement of *Allium*. In: SHARP, W.P.; AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A. YAMADA, Y. (eds.). **Handbook of Plant Cell Culture**, New York, 1985. v.4.
- PASQUALETTO, P.L.; ZIMMERMAN, R. H.; FORDHAM, I. Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of "Gala" apple *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.11, n.6, p.976-980, Nov. 1986.
- PIKE, L.M. Onion breeding. In: BASSET, M.J. (ed.). **Breeding Vegetable Crops**, Westport, AVI Publishing Co., 1986. Chapter 10, p.357-394.
- QI-GUANG, Y.; READ, P.E.; FELLMAN, C.D. e HOSIER, M.A. Effect of cytokinin, IBA, and rooting regime on chinese chestnut cultured *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v.21, n.1, p.133-134, Feb. 1986.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticultural**, v.78, p.437-442, 1977.
- SMITH, R.H.; MURASHIGE, T. *In vitro* development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. **American Journal of Botany**, v.57, p.562-568, 1970.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulations of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biol.** v.11, p.188-130, 1957.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. 433p.

4 FATORES QUE INFLUENCIAM NA BULBIFICAÇÃO *IN VITRO* DE CEBOLA (*Allium cepa* L.)

RESUMO

Para viabilizar o processo de micropropagação a partir de explantes secundários, bem como a aclimação de materiais selecionados, torna-se necessária a indução de bulbificação *in vitro*. Alguns fatores importantes que influenciam no processo da microbulbificação foram investigados.

Explantes secundários com aproximadamente 40,0 mm de altura das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce obtidos de meristemas foram inoculados em meio MS modificado, com 60 g/L de sacarose e mantidos em duas temperaturas 25 e 30°C. Aos 60 dias verificou maior desenvolvimento dos bulbinhos em 30°C, enquanto para altura das plântulas a temperatura de 30°C foi melhor para Pira Ouro e 25°C para Pirana Precoce.

Explantes secundários da cultivar Pira Ouro e o híbrido intervarietal entre Pira Ouro e Pirana Precoce, com 20,0 a 30,0 mm de altura obtidos de bulbo foram inoculados no meio MS modificado e suplementado com 30, 60, 90 e 120 g/L de sacarose. Foram avaliados o diâmetro do bulbinho e da haste, taxa de bulbificação, altura das plântulas e peso da matéria fresca. Melhores resultados aos 60 e 180 dias foram observados nos dois materiais quando se utilizou 90 e 120 g/L de sacarose, com exceção para menor altura das plântulas. Maior porcentagem de sobrevivência na aclimação também foi observada nestas concentrações, após 20 dias de cura.

Plântulas micropropagadas a partir do 1º ciclo de bulbinho *in vitro* das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce, apresentando diferentes diâmetros basais: P (< 2,0 mm), M (2,0 a 3,0 mm) e G (> 3,0 mm), seccionadas a 20,0 mm da base foram inoculadas no meio MS modificado, com 90 g/L de sacarose, sólido e líquido. Foram avaliados os diâmetros do bulbinho e da haste, taxa de bulbificação, altura das plântulas e número de raízes. Aos 90 dias verificou-se que a bulbificação ocorreu nos dois meios, porém plântulas mais desenvolvidas e bulbinhos mais vigorosos foram observados no meio sólido a partir de plântulas com diâmetro maior que 2,0 mm.

Explantos secundários da cultivar Pira Ouro com 20,0 mm de altura foram inoculados em meio MS modificado, com 120 g/L de sacarose, nitrogênio total (60,0; 39,4 e 18,8 mM) e mantidos em 3 fotoperíodos (8/16, 12/12 e 16/8 horas de luz). Aos 60 dias foram avaliados os diâmetros do bulbinho e da haste, taxa de bulbificação, altura das plântulas e número de raízes. Verificou-se bulbinhos mais desenvolvidos, com menor diâmetro da haste e plântulas com menor altura no fotoperíodo de 16/8 horas de luz e escuro em meio com 60 mM de nitrogênio. Melhor resposta para bulbificação *in vitro* foi verificada na temperatura de 30°C, em 16/12 horas de luz e escuro, no meio sólido, com 120 g/L de sacarose e 60 mM de nitrogênio, utilizando explantes com diâmetro maior que 2,0mm.

4.1 REFERENCIAL TEÓRICO

A indução de bulbificação *in vitro* tem sido descrita com sucesso para o gênero *Allium* sp., principalmente para o alho (Nagakubo, Nagasawa e Ohkawa, 1993; Racca, 1989; Racca et al., 1989; Manual de Intercambio y Propagación de Germoplasma de Ajo através de microbulbillos, 1991; Illg et al., 1983; Illg e Siqueira, 1986), alho e chalota (Mohamed-Yasseen, Splittstoesser e Litz, 1994).

A bulbificação *in vitro*, de cultivares ou linhas promissoras de alho, poderão facilitar não somente a transferência de materiais micropropagados, como também o intercâmbio de germoplasma (Racca, 1989).

Segundo Racca (1989), a utilização de 50 g/L de sacarose em cultura *in vitro* de alho, acarretou um aumento do stress hídrico através do aumento do potencial osmótico do meio de cultura. Esse stress induziu a bulbificação em alho dentro de um período de 6 semanas, obtendo-se assim bulbilhos com diâmetros que variaram de 2 a 10 mm, semelhantes a um pequeno dente de um bulbo de alho normal.

Nagakubo, Nagasawa e Ohkawa (1993), trabalhando com cultivares de alho de ciclo precoce e tardio e duas condições de fotoperíodo e luminosidade, observaram altas porcentagens de formação de bulbilho *in vitro* quando inocularam brotos individualizados em meio LS, sem reguladores de crescimento, 30 g/L de sacarose, fotoperíodo de 16/8 horas de luz e escuro e temperatura de 25°C. Os mesmos autores estudando o efeito da temperatura e concentração de sacarose na bulbificação de alho *in vitro* da cv. Howaito-roopen (ciclo tardio), observaram que brotos mantidos *in vitro*, por 4 a 6 meses em baixa temperatura, bulbificaram em concentrações de 60 a 120 g/L de sacarose.

Slabber et al. (1993) estudando o efeito da temperatura sobre a regeneração de bulbinhos a partir de segmentos de escamas de bulbos de *Crinum macowanii* Back. (Amaryllidaceae), verificaram que entre as temperaturas de 15°, 25° e 30°C, maior desenvolvimento de plântulas, enraizamento e bulbificação foram observados na temperatura de 25°C tanto aos 54 como aos 96 dias.

Hussey (1978), estudando o efeito da temperatura em plântulas de cebola da cultivar Senshyu e um híbrido similar, verificou que as plântulas apresentaram melhor desenvolvimento na temperatura de 25°C em comparação à 20°C e 15°C, porém as folhas se apresentaram com coloração verde menos intenso em relação às demais temperaturas.

Broto de alho da cv. Extra Select Sets, divididos no sentido longitudinal através do plano meristemático e inoculados em meio de cultura MS suplementado com 120 g/L de sacarose, 5 g/L de carvão ativado e fotoperíodo de 18/6 horas de luz e escuro produziram em média 6,8 bulbilho por explante quando comparados com brotos inoculados intactos (1 bulbilho/explante), (Mohamed-Yasseen, Splittstoesser e Litz, 1994).

Na cebola, apesar de ser uma cultura propagada via semente, segundo Andrew (1951), a obtenção de bulbinhos pode ser uma maneira de manter a uniformidade genética de materiais melhorados, principalmente linhas macho-estéreis. Segundo o autor, bulbinhos foram obtidos a partir de tecidos de inflorescência, após a remoção dos botões florais, seguida da pulverização das umbelas com água.

Thomas (1972), pulverizando inflorescências de quatro cultivares de cebola, com água e 6 reguladores de crescimento, também após a remoção dos botões florais, verificou que BA induziu maior número médio de bulbinhos por inflorescência.

A bulbificação *in vitro* para o gênero *Allium* tem sido pouco explorada. A maioria dos trabalhos existentes na literatura estão mais relacionados com a espécie *Allium sativum*, e para *Allium cepa* são poucos os estudos realizados.

Matsubara e Hihara (1978), obtiveram bulbinhos a partir de inflorescências da cv. Awaji Chukodaka quando pulverizadas com BA ou água e de plântulas *in vitro* regeneradas a partir de inflorescências, em diversos estágios de desenvolvimento, quando inoculadas em meio MS suplementado ou não com BA e ANA.

Segundo Mohamed-Yasseen e Splittstoesser (1992), altas concentrações de sacarose são necessárias para promover a bulbificação *in vitro* em cebola.

A bulbificação *in vitro* de cebola da cv. Sweet Spanish, a partir de explantes de inflorescências e plântulas regeneradas de inflorescências, também foi obtida por Mohamed-

Yasseen, Splittstoesser e Litz (1993) em meio MS suplementado com 120 g/L de sacarose, 5 g/L de carvão ativado e fotoperíodo de 18/6 horas de luz e escuro.

A exemplo de outras espécies com órgãos de reserva, Ewing (1985), acredita que para a batata, apesar da necessidade da ocorrência de mudanças hormonais para acionar a tuberação, os carboidratos desempenham também um papel relevante. Segundo Teixeira e Pinto (1991), a utilização de 60 e 120 g/L de sacarose suprimiram satisfatoriamente os tubérculos de carboidratos, não sendo necessário a utilização da citocinina BAP.

Alta taxa de bulbificação *in vitro* em cebola (cv. Stuttgarter Riesen) e alho-poró (cv. Poros) foi obtida por Keller (1993), através da combinação de sacarose e de ethefon. A combinação de sacarose e BA causou tanto o aumento do tamanho do bulbinho, como também um aumento na formação de brotos adventícios.

O nitrogênio influencia o crescimento e desenvolvimento em muitas espécies de plantas. Geralmente o nitrato é a fonte preferencial, mas a magnitude da preferência varia com a espécie e outros fatores ambientais (Barker e Mills, 1980). Segundo o mesmo autor altas concentrações de $\text{NH}_4\text{-N}$ em solução podem ser tóxicas e prejudicar o desenvolvimento das plantas enquanto em baixas concentrações, em estágios de desenvolvimento específico, tem aumentado o desenvolvimento das plantas.

Segundo Magalhães (1986) a presença de nitrogênio na forma amoniacal, levando a uma baixa taxa de nitrificação, com possível toxidez de NH_4^+ no início do crescimento, e disponibilidade maior do NO_3^- na fase crítica, tem prejudicado a bulbificação de alho causando um pseudoperfilhamento no final do ciclo.

Em cebola um nível ótimo de nitrogênio é necessário para maximizar a produção e a performance da cultura (Brewster e Butler, 1989; Smittle, 1984; Vavrina e Granberry, 1988). O excesso de nitrogênio, quando aplicado no final do ciclo da cultura, pode limitar a produção levando à formação de bulbos maiores com a presença de charuto (Maluf, 1992;

Riekels, 1972 e Sypien et al., 1973) e também aumentar as perdas durante a armazenagem (Vaughan et al., 1964), assim como para a batata doses elevadas de nitrogênio podem atrasar a tuberização (Santelith e Ewing, 1981).

O efeito da forma de Nitrogênio aplicado, sobre a produção de cebola, não tem recebido muita atenção. No entanto, estudos realizados por Gamiely et al. (1991), sobre o efeito que o Nitrogênio exerce no crescimento das plantas e qualidade do bulbo, em solução nutritiva, nas condições de casa-de-vegetação, revelaram que o maior diâmetro de bulbo foi obtido, no final de 11 semanas, para a relação de 3:1 de $\text{NH}_4\text{-N}:\text{NO}_3\text{-N}$, menor diâmetro da haste na relação de 1:0 e maior taxa de bulbificação na relação de 1:0. A bulbificação precoce foi obtida somente quando o $\text{NH}_4\text{-N}$ foi a fonte de Nitrogênio e esta bulbificação não teve correlação com o maior peso fresco obtido no final, indicando que o bulbinho não precisa, necessariamente, ter alta taxa de bulbificação inicial para ter alto peso de matéria fresca final.

Segundo Brewster et al., citado por Gamiely et al. (1991), a determinação da taxa de bulbificação serve para indicar a ocorrência de bulbificação em cebola. Quando este parâmetro atinge o valor dois significa que o processo de bulbificação está se iniciando, tanto em condições de campo, como em casa-de-vegetação.

4.2 EFEITO DA TEMPERATURA NA BULBIFICAÇÃO *IN VITRO*

4.2.1 OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de duas condições de temperaturas (25 e 30°C), na bulbificação *in vitro* de cebola.

4.2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas *in vitro* desenvolvidas a partir de meristemas de bulbos com diâmetro variando entre 30,0 a 40,0 mm, das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce, foram utilizadas para extração dos explantes secundários.

Os explantes com $\pm 40,0$ mm de altura foram inoculados em tubos de ensaio contendo aproximadamente 13 ml de meio de cultura MS(1962), modificado pela adição de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (300 mg/L), sacarose (60 g/L), pH ajustado para 5,9 e agar (7,0 g/L). Os tubos contendo meio de cultura foram fechados com tampa plástica e autoclavados a 120°C por 20 minutos.

Os experimentos foram analisados separadamente para cada cultivar, tendo em vista que o interesse foi determinar qual a melhor temperatura na resposta de bulbificação. Portanto, cada cultivar foi mantida em duas estufas incubadoras tipo BOD, marca FANEM, com temperaturas ajustadas para 25° e 30°C, respectivamente, constituindo dois tratamentos. Nas duas temperaturas, o fotoperíodo utilizado foi de 12/12 horas de luz e escuro, com 1.500 lux de luminosidade.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com 12 repetições por tratamento.

As avaliações foram realizadas aos 60 dias medindo-se o diâmetro da parte basal do bulbinho e altura das plântulas.

4.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas condições do presente experimento verificou-se que a temperatura influenciou no processo de bulbificação *in vitro* das duas cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce.

Para a cultivar Pira Ouro, apenas o diâmetro de bulbinho mostrou diferença significativa entre as médias (Tabela 7), sendo a maior (6,71 mm) observada em 30°C. Na cultivar Pirana Precoce observa-se que as diferentes temperaturas não afetaram significativamente o diâmetro dos bulbinhos e altura das plântulas.

TABELA 7. Resumo das análises de variância para diâmetro do bulbinho e altura das plântulas, da cultivar Pira Ouro Pirana Precoce mantidas em duas temperaturas. Avaliação aos 60 dias.

F.V.	G.L.	Quadrados médios			
		Pira Ouro		Pirana Precoce	
		Diâmetro do Bulbinho	Altura das Plântulas	Diâmetro do Bulbinho	Altura das Plântulas
Temperatura	1	0,2301*	47,3203	0,0017	18,3550
Resíduo	22	0,0352	24,4977	0,0460	21,7538
C.V. (%)		32,756	35,280	36,244	39,003

Apesar das médias observadas para altura das plântulas, da cultivar Pira Ouro, não diferirem estatisticamente, a maior média foi observada em 30°C (154,33 mm), enquanto para a cultivar Pirana Precoce a maior média para diâmetro de bulbinho foi de 5,83 mm em 30°C e para altura das plântulas foi de 128,33 mm em 25°C (Figura 7).

A temperatura de 30°C se mostrou mais favorável para o processo de bulbificação *in vitro* da cultivar Pira Ouro, indicando que temperaturas mais elevadas são necessárias para acelerar a microbulbificação em cebola (Figura 7). Verifica-se pela Figura 8 bulbinhos das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce desenvolvidos nas duas temperaturas.

Observou-se que a cultivar Pira Ouro apresentou maior desenvolvimento de parte aérea na temperatura de 30°C, enquanto Pirana Precoce na temperatura de 25°C (Figura 7), ou seja, em temperatura mais elevada a cultivar Pira Ouro apresentou melhores

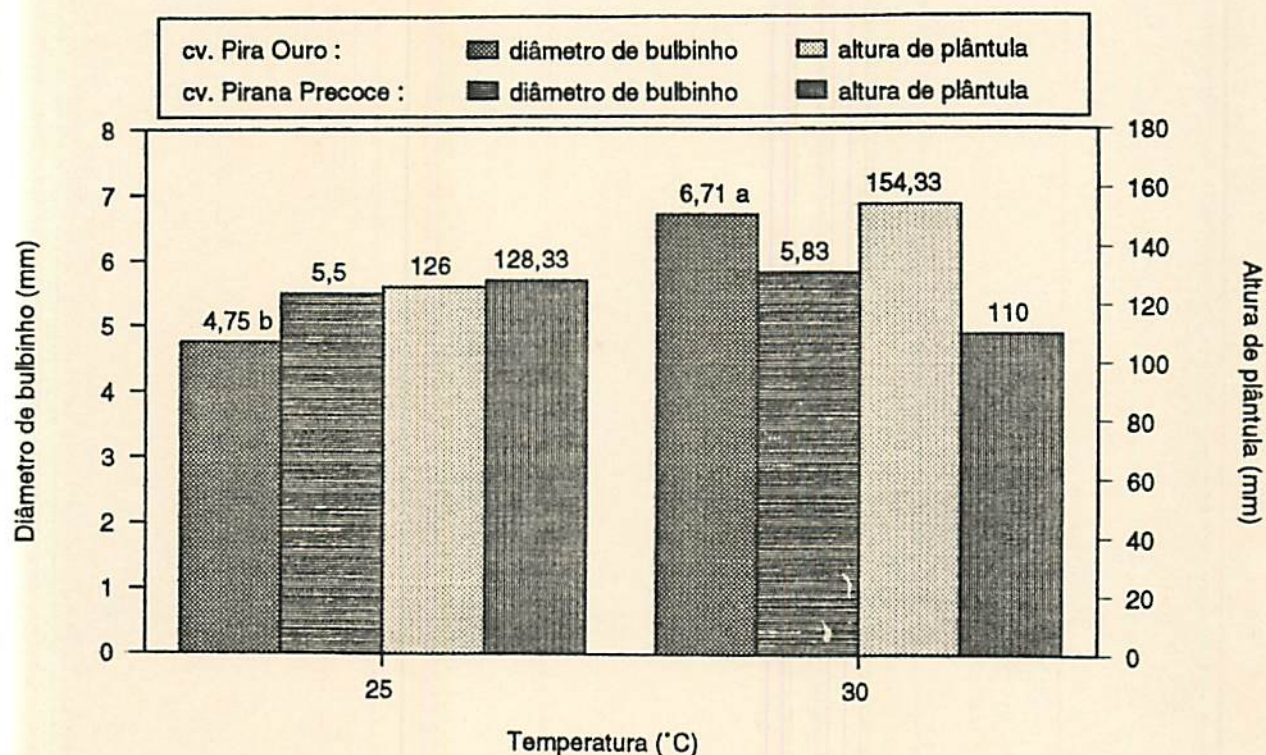


FIGURA 7. Diâmetro dos bulbinhos (mm) e altura das plântulas (mm) das cultivares Pira Ouro e Pira Precoce mantidas em duas temperaturas.

respostas assim como as obtidas por Hussey (1978) trabalhando com a cultivar Senshyu e híbrido similar.

Slabber et al. (1993) trabalhando com tecidos de bulbos de *Crinum macowanii* Back. (Amaryllidaceae), obteve plântulas mais vigorosas e com diâmetros maiores de bulbilhos na temperatura de 25°C tanto a 8 como a 12 semanas de cultivo. Entretanto, nos resultados aqui apresentados, os maiores diâmetros para as duas cultivares, foram observados na temperatura de 30°C, a 8 semanas de cultivo.

Nagakubo, Nagasawa e Okawa (1993), trabalhando com a espécie *Allium sativum*, mostram a necessidade de um pré-tratamento das plântulas de alho a baixa temperatura (5°C) por 6 meses e em seguida a bulbificação na temperatura de 25°C por dois meses. A cebola apesar de pertencer ao mesmo gênero, não necessita de pré-tratamento a



FIGURA 8. Bulbificação *in vitro* das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce, em duas condições de temperatura.

baixas temperaturas para indução da bulbificação, mostrando portanto ser mais exigente a temperaturas mais elevadas.

4.2.4 CONCLUSÕES

Pelas avaliações realizadas aos 60 dias, a temperatura de 30°C se mostrou mais adequada para indução de bulbificação em relação à 25°C, tendo as cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce apresentado médias de 6,71 mm e 5,83 mm, respectivamente, para diâmetro de bulbinho.

4.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA BULBIFICAÇÃO *IN VITRO*

4.3.1 OBJETIVO

Este trabalho objetivou avaliar o efeito de quatro concentrações de sacarose (30, 60, 90 ou 120 g/L) na bulbificação *in vitro* e aclimação dos bulbinhos da cultivar Pira Ouro e do híbrido entre Pira Ouro e Pirana Precoce.

4.3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Explantos secundários com 20,0 a 30,0 mm de altura de 'Pira Ouro' e o híbrido intervarietal entre 'Pira Ouro' e 'Pirana Precoce' denominado H-120 foram obtidos a partir de túnicas unidas por segmento de disco basal, extraídos de bulbos com diâmetro variando entre 30,0 a 40,0 mm. Estes foram inoculados em tubos de ensaio contendo $\pm$ 13 ml do meio de cultura MS (1962), acrescido de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (300 mg/L), sacarose nas concentrações de 30, 60, 90 ou 120 g/L (correspondendo a 4 tratamentos), pH ajustado para 5,9 e agar (7,0 g/L).

O experimento foi mantido em estufa incubadora tipo BOD, marca FANEM, com temperatura ajustada para 30°C e com fotoperíodo de 12/12 horas de luz e escuro, respectivamente e 1.500 lux de luminosidade.

Os experimentos foram realizados separadamente para cada material e o delineamento experimental foi o de blocos casualizados com 4 repetições por tratamento e 4 plântulas por repetição.

As plântulas foram submetidas à duas épocas de avaliações: aos 60 e aos 180 dias.

Aos 60 dias determinou-se o diâmetro da parte basal do bulbinho, diâmetro da haste, taxa de bulbificação (diâmetro do bulbinho dividido pelo diâmetro da haste) e altura das plântulas.

Na segunda época, quando os bulbinhos atingiram a maturidade (6 meses), estes foram retirados do meio de cultura, lavados com água destilada, secados com papel toalha e avaliados quanto ao diâmetro do bulbinho, diâmetro da haste, taxa de bulbificação e peso da matéria fresca dos bulbinhos.

A aclimação foi realizada após um período de aproximadamente 20 dias de cura em ambiente natural. Inicialmente os bulbinhos foram tratados com fungicida Rovral (2,0 g/L) e em seguida plantados em copinhos plásticos contendo substrato (vermiculita) e transferidos para casa-de-vegetação para aclimação. Aos 60 dias após o plantio foram avaliados quanto à porcentagem de plântulas desenvolvidas, provenientes dos bulbinhos, e em seguida foram transferidas para sacos de polietileno de 2 Kg, contendo solo preparado.

4.3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas avaliações realizadas aos 60 dias para a cultivar Pira Ouro (Tabela 8), verificou-se diferenças entre as médias nos níveis de sacarose para diâmetro do bulbinho ($P < 0,05$), taxa de bulbificação e altura das plântulas ($P < 0,01$), enquanto no Híbrido-120 apenas a altura das plântulas mostrou diferença significativa ($P < 0,01$) entre as médias observadas

TABELA 8. Resumo das análises de variância para diâmetro de bulbinho e da haste, taxa de bulbificação e altura das plântulas da cultivar Pira Ouro e do Híbrido-120 obtidas em diferentes concentrações de sacarose. Avaliação aos 60 dias.

F.V.	G.L.	Quadrados médios							
		Pira Ouro				Pirana Precoce			
		Diâmetro (mm)		Taxa de Bulbificação	Altura (mm)	Diâmetro (mm)		Taxa de Bulbificação	Altura (mm)
		Bulbinho	Haste			Bulbinho	Haste		
Bloco	3	0,0473	0,0013	0,2523	9,2677	0,0052	0,0016	0,2369	33,4725*
Sacarose (S)	3	0,1433*	0,0079	1,4038**	99,7194**	0,0795	0,0019	1,2754	76,0829**
Resíduo (a)	9	0,0253	0,0031	0,1733	5,0195	0,0365	0,0016	0,3480	8,6114
C.V. (%)		22,354	17,658	18,220	18,220	23,620	11,847	24,607	25,986

* - Significativo ao nível de 5% pelo Teste F.

** - Significativo ao nível de 1% pelo Teste F.

para os níveis de sacarose. A Figura 9 mostra que as concentrações de sacarose influenciaram o aumento da taxa de bulbificação, explicada pela equação da regressão linear, com maior taxa (2,96) ocorrida em 120 g/L de sacarose e o aumento do diâmetro do bulbinho, com maior diâmetro (9,58 mm) observado em 90 g/L de sacarose. Embora não se tenha observado diferenças estatísticas entre as médias do diâmetro da haste, concentrações mais elevadas de sacarose também contribuíram para as menores médias (Tabela 9). Uma diminuição na altura das plântulas foi verificada pela influência da sacarose e a menor altura (73,3 mm) foi observada em 120 g/L de sacarose, sendo este comportamento explicado pela equação de regressão linear (Figura 10).

Nas avaliações realizadas aos 180 dias para a cultivar Pira Ouro (Tabela 10), diâmetro de bulbinho, taxa de bulbificação e peso da matéria fresca mostraram diferenças entre as médias ($P < 0,01$) para os níveis de sacarose. O aumento do diâmetro de bulbinho apresentou um comportamento linear crescente nas concentrações de 60 a 90 g/L de sacarose, mantendo-se estável até 120 g/L (Figura 11).

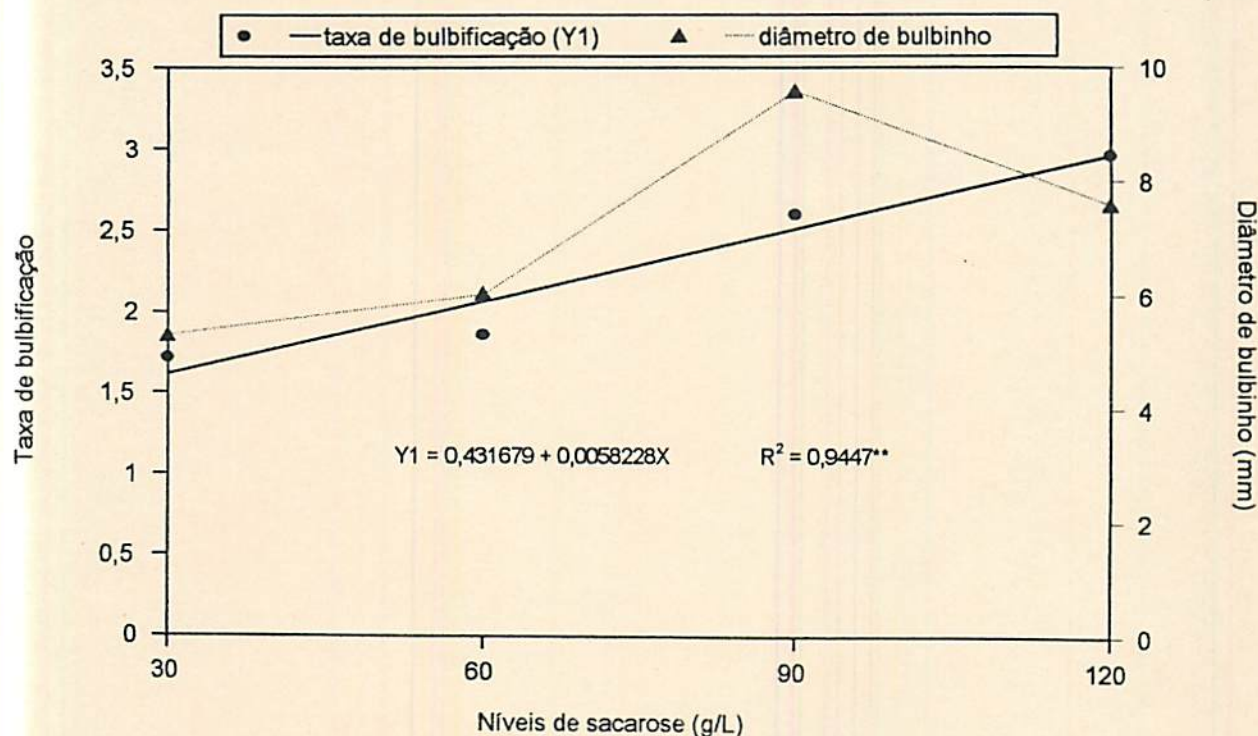


FIGURA 9. Efeito de concentrações de sacarose sobre o diâmetro dos bulbinhos e taxa de bulbificação da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 60 dias.

TABELA 9. Médias observadas para diâmetro do bulbinho, da haste, taxa de bulbificação e altura das plântulas da cultivar Pira Ouro e do Híbrido-120, em diferentes concentrações de sacarose. Avaliação realizada aos 60 dias.

Concentração de sacarose	Diâmetro (mm)				Taxa de Bulbificação		Altura (mm)	
	Bulbinho		Haste					
	P. Ouro*	H-120	P. Ouro	H-120	P. Ouro**	H-120	P. Ouro**	H-120**
30	5,30	6,58	3,13	3,60	1,72	1,85	189,70	171,90
60	6,03	7,20	3,28	3,65	1,86	1,98	157,95	115,10
90	9,58	9,23	3,65	3,28	2,60	2,82	122,50	95,65
120	7,58	9,35	2,58	3,23	2,96	2,94	73,30	69,05

O peso de matéria fresca apresentou um comportamento crescente nos níveis de 60 a 90 g/L, diminuindo a 120 g/L e a taxa de bulbificação apresentou a maior média em 120 g/L, sendo este aumento explicado pela equação de regressão linear (Figura 12).

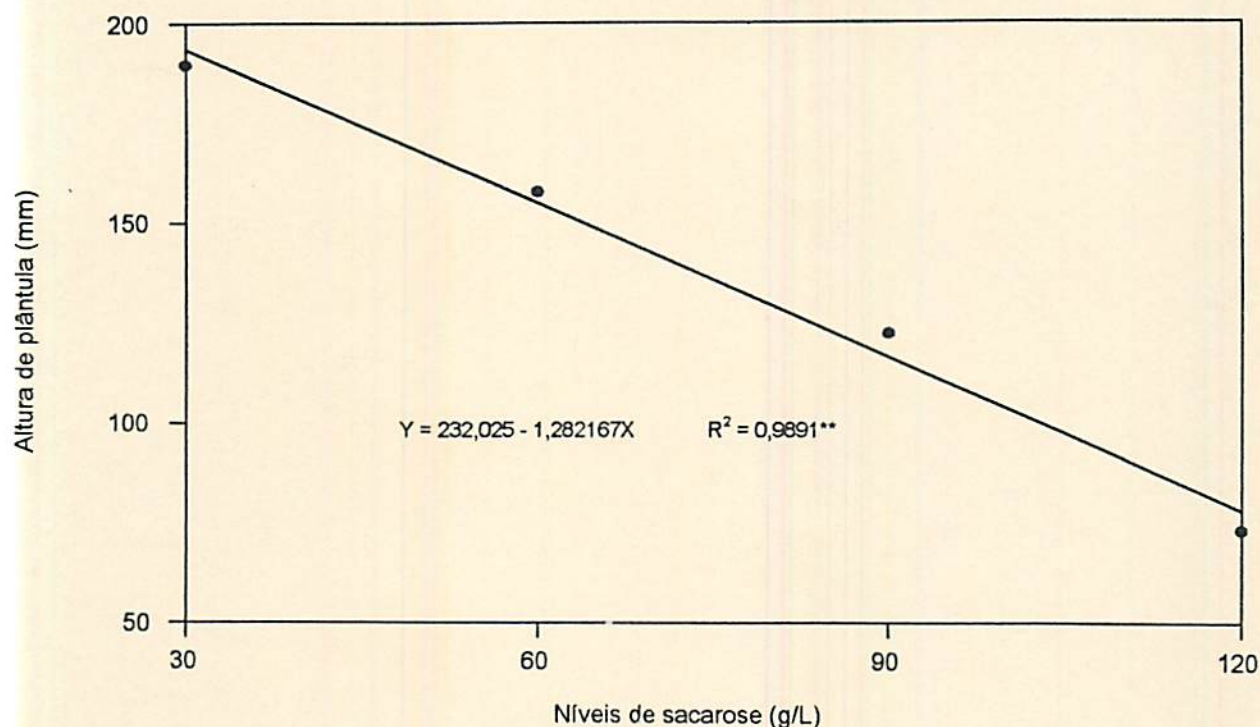


FIGURA 10. Efeito de concentrações de sacarose sobre a altura das plântulas da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 60 dias.

TABELA 10. Resumo das análises de variância para diâmetro de bulbinho, da haste, taxa de bulbificação e peso de matéria fresca de bulbinhos da cultivar Pira Ouro e do Híbrido-120 obtidos em diferentes concentrações de sacarose. Avaliação aos 180 dias.

F.V.	G.L.	Quadrados médios						
		Pira Ouro				Pirana Precoce		
		Diâmetro (mm)		Taxa de Bulbi-ficação	Peso Matéria Fresca	Diâmetro (mm)		Taxa de Bulbi-ficação
		Bulbinho	Haste			Bulbinho	Haste	
Bloco	3	2,3273	0,5001	0,0926	31,4850	1,4050	1,6529	0,7116
Sacarose (S)	3	59,9439**	1,3423	4,7192**	472,8333**	24,1617	0,3289	2,2189**
Resíduo (a)	9	6,9850	0,9534	0,1597	57,3628	6,1156	0,2239	0,2157
C.V. (%)		24,150	23,779	14,813	37,494	22,688	11,421	17,121
								39,393

* Significativo ao nível de 5% pelo Teste F.

** Significativo ao nível de 1% pelo Teste F.

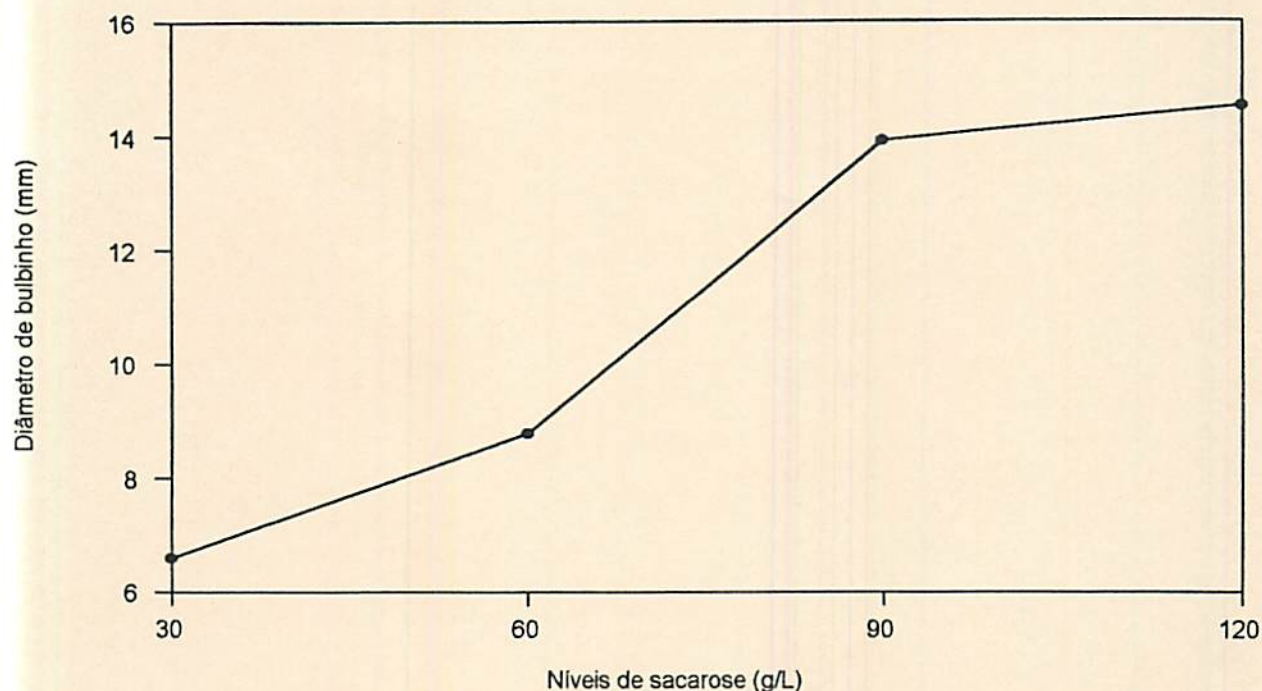


FIGURA 11. Efeito de concentrações de sacarose sobre o diâmetro dos bulbinhos da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 180 dias.

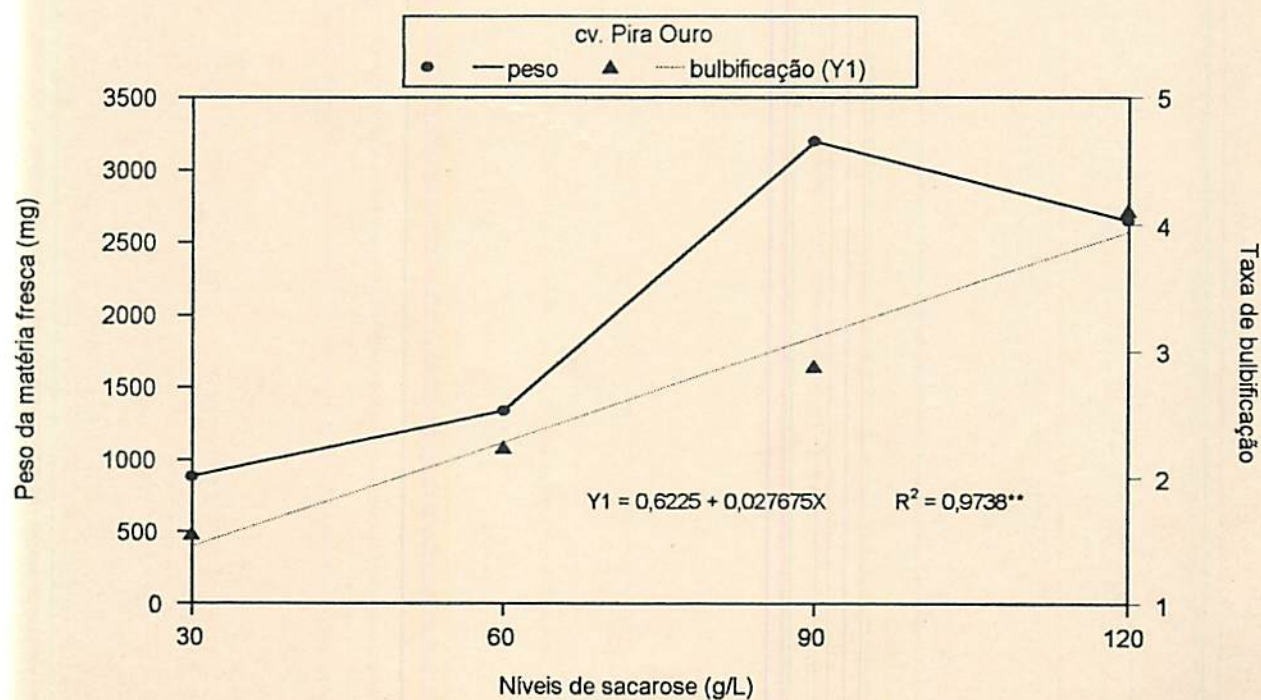


FIGURA 12. Efeito de concentrações de sacarose sobre o peso da matéria fresca dos bulbinhos e taxa de bulbificação da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 180 dias.

Verifica-se para a cultivar Pira Ouro (Tabela 11) que a concentração de 90 g/L de sacarose foi responsável pela maior média de peso da matéria fresca (3.200 mg) enquanto a de 120 g/L pela maior taxa de bulbificação (4,11) e diâmetro do bulbinho (14,5 mm) e a menor média verificada para o diâmetro da haste foi de 3,4 mm em 120 g/L de sacarose.

TABELA 11. Médias observadas para o diâmetro do bulbinho e da haste, taxa de bulbificação e peso da matéria fresca de bulbinhos da cultivar Pira Ouro e do Híbrido-120 em diferentes concentrações de de sacarose. Avaliação realizada aos 180 dias.

Concentração de sacarose	Diâmetro (mm)				Taxa de Bulbificação		Peso da Matéria Fresca (mg)	
	Bulbinho		Haste		P. Ouro**	H-120	P. Ouro**	H-120
	P. Ouro**	H-120	P. Ouro	H-120				
30	6,60	8,13	4,30	4,48	1,55	1,87	883,10	955,00
60	8,75	9,55	3,90	4,18	2,25	2,32	2221,00	1452,50
90	13,90	13,18	4,80	4,15	2,88	3,22	3200,40	3162,50
120	14,50	12,75	3,40	3,78	4,11	3,44	2653,30	2600,00

A cultivar Pira Ouro apresentou o mesmo comportamento para o diâmetro do bulbinho e taxa de bulbificação nas duas avaliações, sendo o efeito da sacarose já observado na primeira avaliação realizada aos 60 dias (Figura 13).

Para o Híbrido-120 (Tabela 8) apenas a altura das plântulas mostrou diferença significativa ($P < 0,01$) entre as médias observadas para sacarose. Na Figura 14, a equação linear está explicando o efeito da sacarose e a menor altura (69,5 mm) foi verificada em 120 g/L de sacarose. Pela Tabela 9 verifica-se para o Híbrido-120 que a maior média observada para diâmetro do bulbinho (9,35 mm), taxa de bulbificação (2,94) e para menor diâmetro da haste (3,23 mm) ocorreram em 120 g/L de sacarose, enquanto nas avaliações realizadas aos 180 dias (Tabela 10), diâmetro do bulbinho e taxa de bulbificação apresentaram diferenças significativas entre as médias ($P < 0,01$) e peso da matéria fresca com $P < 0,05$ para os níveis de sacarose, como observado na cultivar Pira Ouro. Os aumentos ocorridos para o diâmetro

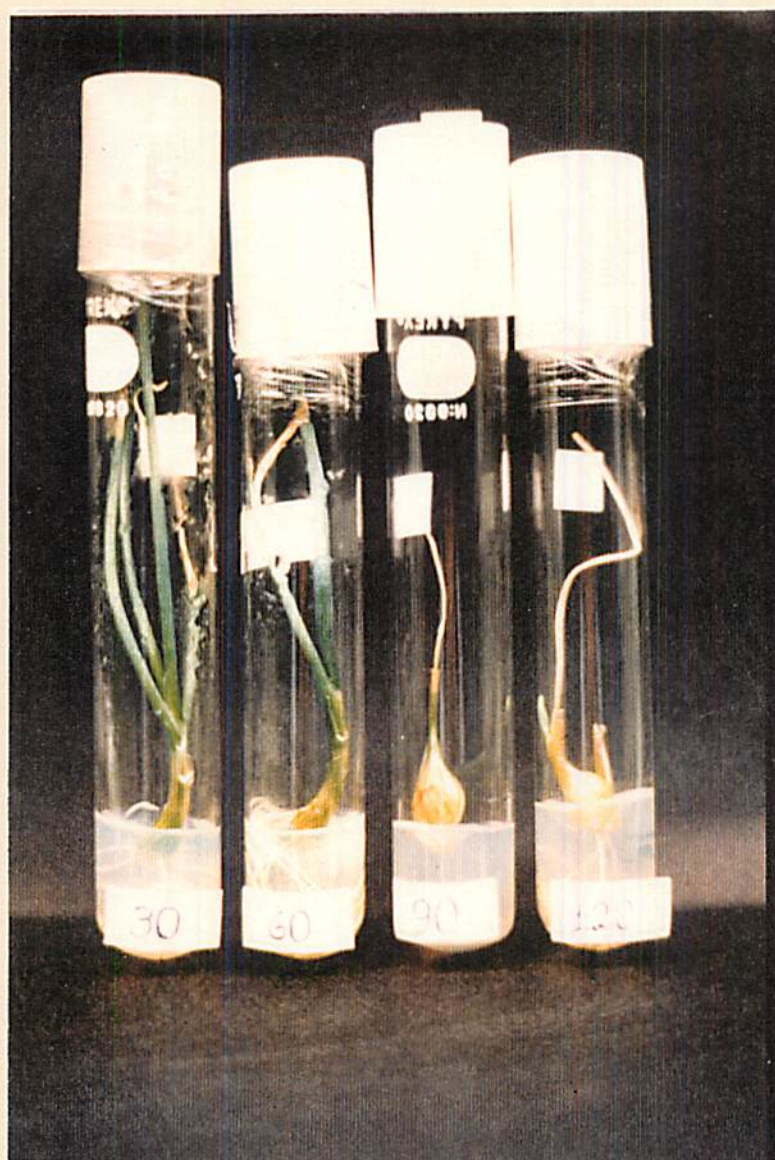


FIGURA 13. Efeito das concentrações de sacarose sobre a bulbificação *in vitro* da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 60 dias.

do bulbinho (Figura 15), e peso de matéria fresca (Figura 16) apresentaram um comportamento crescente nos níveis de 60 a 90 g/L de sacarose, sendo as maiores médias observadas em 90 g/L. Os aumentos verificados para taxa de bulbificação (Figura 16) são explicados pela equação de regressão linear.

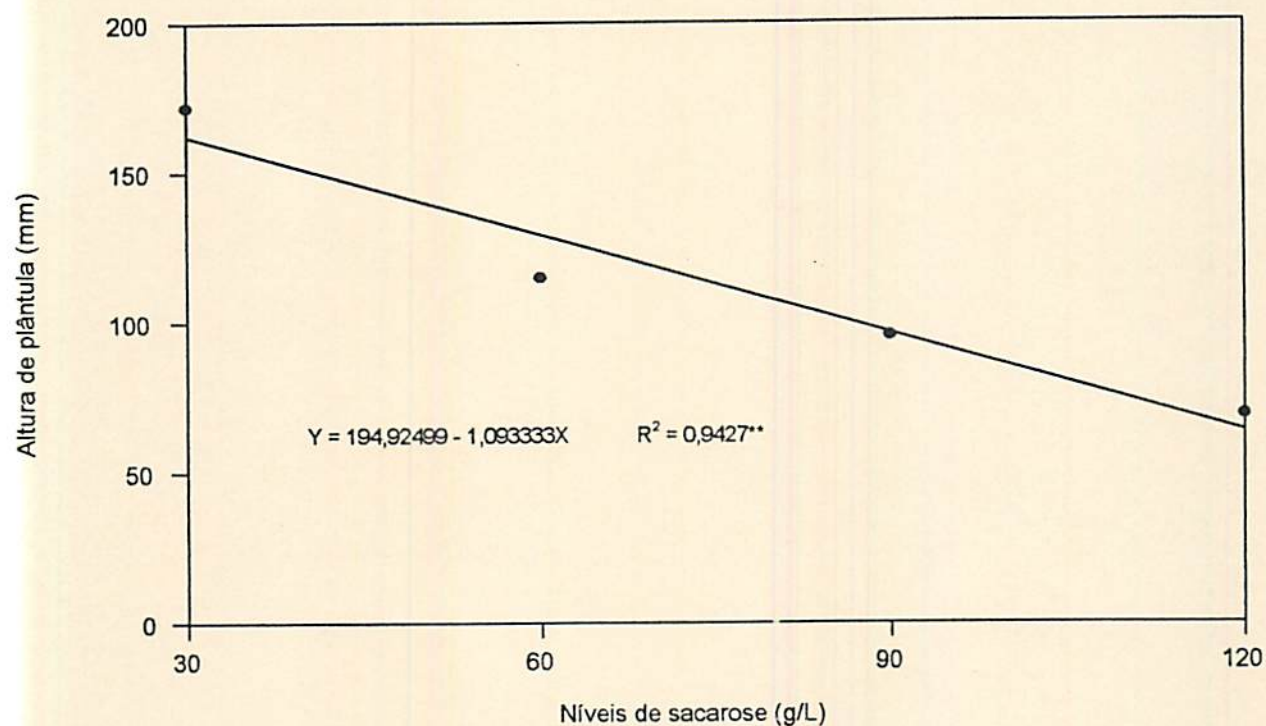


FIGURA 14. Efeito de concentrações de sacarose sobre a altura das plântulas do híbrido intervarietal (H-120). Avaliação aos 60 dias.

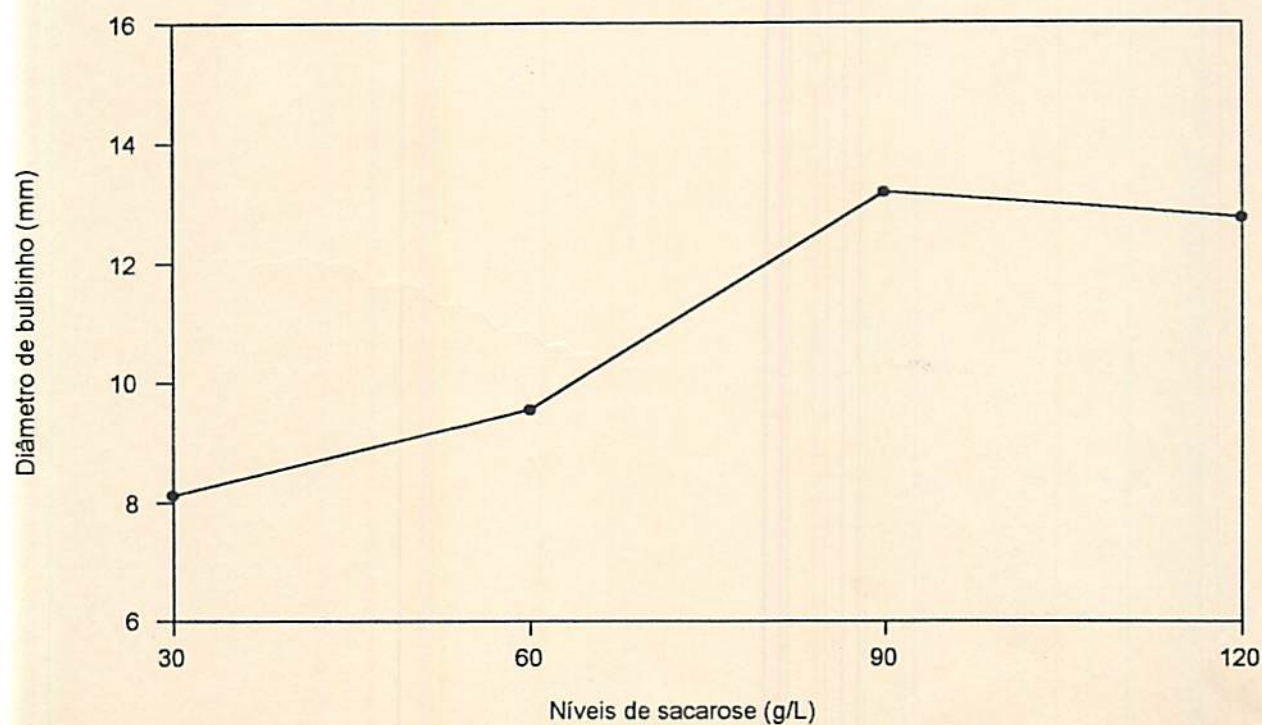


FIGURA 15. Efeito de concentrações de sacarose sobre o diâmetro dos bulbinhos do híbrido intervarietal (H-120). Avaliação aos 180 dias.

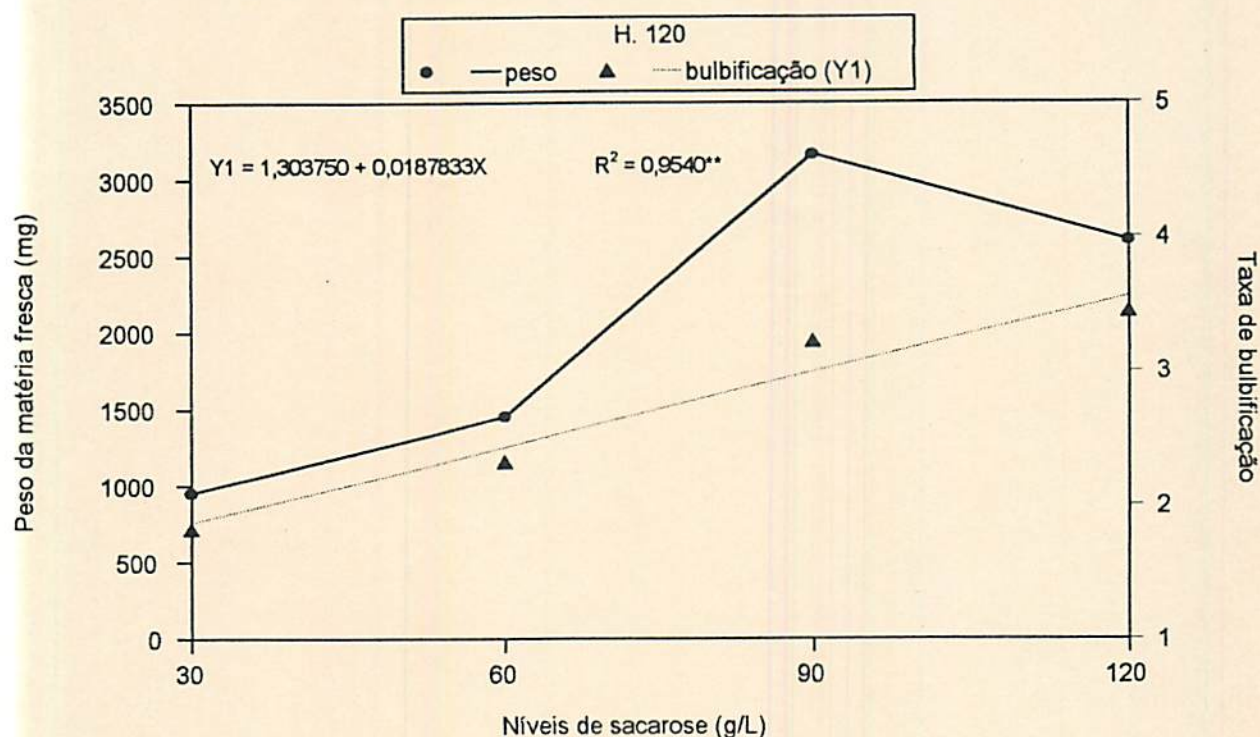


FIGURA 16. Efeito de concentrações de sacarose sobre a taxa de bulbificação e peso da matéria fresca dos bulbinhos do híbrido intervarietal (H-120). Avaliação aos 180 dias.

Nas avaliações realizadas aos 60 dias (Tabela 9), verifica-se tanto para Pira Ouro, quanto para o Híbrido-120, que o aumento dos níveis de sacarose acarretou aumento do diâmetro dos bulbilhos e da taxa de bulbificação, e consequentemente diminuiu a altura das plântulas, mostrando a influência da sacarose no processo de bulbificação, ou seja, a plântula está translocando os metabólitos para a região de armazenamento em detrimento da altura das plântulas.

As menores alturas das plântulas da cultivar Pira Ouro e o híbrido intervarietal observadas nas concentrações mais elevadas de sacarose podem estar relacionados ao excessivo potencial osmótico do meio, concordando com Grattapaglia e Machado (1990) onde concentrações acima de 4% aumentaram o potencial osmótico afetando a multiplicação e o desenvolvimento das culturas.

O efeito de concentrações mais elevadas de sacarose no processo de bulbificação ocorridos para a cultivar Pira Ouro e o Híbrido-120 corroboram aos resultados obtidos com cebola por Mohamed-Yasseen e Splittstoesser (1992); Mohamed-Yasseen, Splittstoesser e Litz (1993) com a cultivar Sweet Spanish; Keeler (1993) com a cultivar Stuttgarter Riesen; com alho por Mohamed-Yasseen, Splittstoesser e Litz (1994); Nagabuko, Nagasawa e Ohkawa (1993); Racca et al. (1989); e com *Lilium aurantum* L., por Takayama e Misawa (1980).

Verifica-se pelas Tabelas 9 e 11 que com exceção do diâmetro da haste, as demais variáveis foram afetadas com o aumento dos níveis de sacarose, ou seja, o diâmetro do bulbinho, taxa de bulbificação e peso de matéria fresca aumentaram e apenas a altura das plântulas reduziu com o aumento dos níveis sacarose.

No presente experimento o início da bulbificação foi verificado aos 15 dias após a transferência para o meio de bulbificação, através do entumescimento da base das folhas, com uma coloração tendendo a verde pálido que foram gradualmente mudando para creme à medida que os bulbinhos aumentaram de volume, durante o período de cultivo.

O ponto de colheita desses bulbinhos foi detectado quando as folhas se apresentaram totalmente secas e com aspecto externo tendendo ao de um bulbo original. Estas observações concordam com aquelas realizadas por outros autores, porém, com a cultura do alho, como Nome, Abril e Racca (1981), Mosella e Fernandes (1985), Câmara (1988) e Racca (1989), os quais verificaram que estas características são ideais para determinar o ponto de maturação.

O período de formação dos bulbinhos até o ponto de colheita foi de aproximadamente 25 semanas para a cultivar Pira Ouro e o Híbrido-120, período este bastante superior ao observado por Mohamed-Yasseen, Splittstoesser e Litz (1993) que foi de 4-6 semanas para brotos e de 10-12 semanas diretamente de inflorescência para a cultivar Sweet

Spanish. O período maior exigido para a bulbificação e maturação provavelmente foi devido à cultivar e a origem dos explantes. O período de bulbificação e maturação observado para o alho por Câmara (1988), Mosella e Fernandes (1985) foi relativamente curto, e por Nagakubo, Nagasawa e Ohkawa (1993) foi longo, como observado nos nossos resultados apresentados para a cebola.

A Tabela 12 mostra que, dos bulbinhos aclimatados, maior peso da matéria fresca foi encontrado na concentração de 90 g/L (3420 mg) quanto para H-120 (3390 mg) e maior taxa de bulbificação foi observada para Pira Ouro (3,91) em 90 g/L e para H-120 (4,55) em 120 g/L de sacarose. Apesar dos bulbinhos desenvolvidos em 60 g/L de sacarose terem mostrado taxa de bulbificação maior que 2,0 também apresentaram menor peso da matéria fresca, em comparação com as concentrações mais elevadas de sacarose, e este fator parece estar contribuindo para o desenvolvimento das plântulas na aclimação.

TABELA 12. Total de plântulas desenvolvidas a partir de bulbinhos obtidos *in vitro*, ao final do processo de aclimação da cultivar Pira Ouro e do Híbrido-120. Avaliação aos 60 dias.

Cultivar	Sacarose (g/L)	Bulbinhos aclimatados	Peso Matéria Fresca (mg/L)	Taxa Bulbifi- cação	Plântulas	
					Nº	%
Pira Ouro	60	04	1.550,00	2,57	0	0,0
Pira Ouro	90	04	3.420,00	3,91	2	50,0
Pira Ouro	120	05	3.040,00	3,42	4	80,0
Híbrido-120	60	04	1.780,00	2,98	1	25,0
Híbrido-120	90	05	3.390,00	3,67	3	60,0
Híbrido-120	120	05	2.700,00	4,55	3	60,0
Total		27			13	48,2

Foram aclimatados um total de 27 bulbinhos, sendo 13 da cultivar Pira Ouro e 14 do Híbrido-120, provenientes de meio de bulbificação contendo 60, 90 e 120 g/L de sacarose.

Após a avaliação realizada aos 60 dias, verificou-se que 13 bulbinhos desenvolveram plantas normais, indicando uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 48,2%. Porcentagens mais elevadas de plântulas desenvolvidas foram provenientes de bulbinhos do meio contendo 120 e 90 g/L de sacarose (62,5%), e certamente esta sobrevivência está relacionada ao maior peso da matéria fresca e maior taxa de bulbificação obtida pelos bulbinhos desenvolvidos nestas concentrações.

As perdas observadas atribuíram-se principalmente à bulbinhos desenvolvidos em meio de cultura contendo 60 g/L de sacarose, os quais apresentaram menor peso da matéria fresca e menor taxa de bulbificação (Tabela 12) e também à incidência de fungos observada logo nos primeiros dias após o plantio em vermiculita.

A Figura 17, ilustra os bulbinhos da cultivar Pira Ouro e do híbrido intervarietal, obtidos em diferentes concentrações de sacarose, aos 180 dias, e aclimação dos mesmos em casa-de-vegetação.

4.3.4 CONCLUSÕES

Nas avaliações realizadas tanto aos 60 quanto aos 180 dias ficou evidente que as concentrações mais elevadas de sacarose (90 e 120 g/L) promoveram o alargamento basal das plântulas resultando no processo de bulbificação *in vitro* da cultivar Pira Ouro e do Híbrido-120.

Os níveis de sacarose 90 e 120 g/L induziram maior diâmetro do bulbinho, maior taxa de bulbificação e peso da matéria fresca. As plântulas regeneradas de bulbinhos desenvolvidos em 90 e 120 g/L de sacarose apresentaram maior taxa de sobrevivência, quando na fase de aclimação.

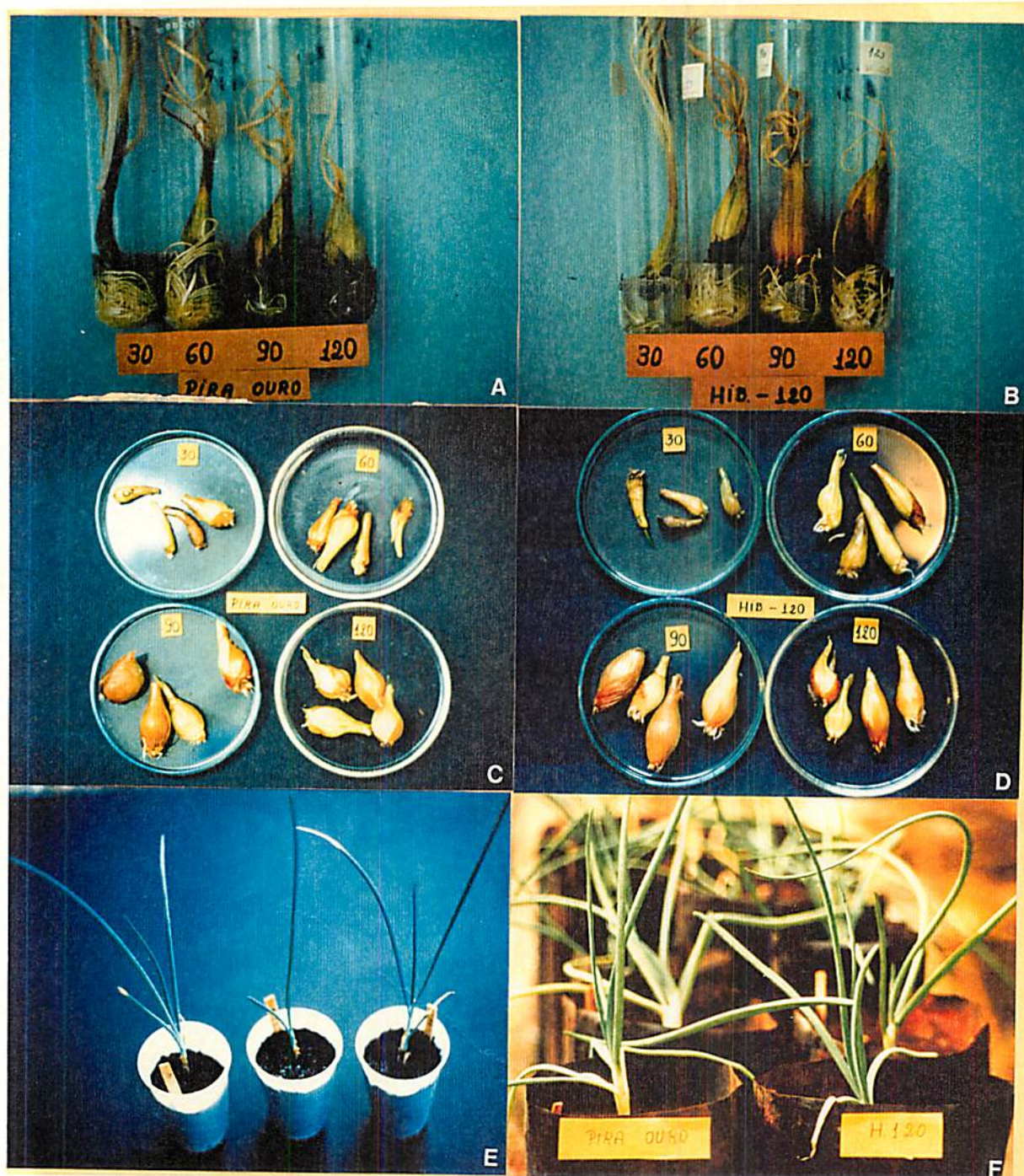


FIGURA 17. Bulbinhos da cultivar Pira Ouro e o Híbrido-120 obtidos em diferentes concentrações de sacarose. Avaliação aos 180 dias. A e B - Folhas bem secas e com películas externa de cor creme; C e D - Amostra dos diferentes tratamentos; E - Acclimação em vermiculita; F - Plantas no solo em casa-de-vegetação.

4.4 EFEITO DA CONSISTÊNCIA DO MEIO DE CULTURA E DO DIÂMETRO DA BASE DA PLÂNTULA NA BULBIFICAÇÃO *IN VITRO*

4.4.1 OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência do meio sólido e líquido e do diâmetro da base da plântula utilizada como explante ($P = < 2,0 \text{ mm}$; $M = 2,0 \text{ a } 3,0 \text{ mm}$; $G = > 3,0 \text{ mm}$) na indução de bulbificação *in vitro* das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce.

4.4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os explantes utilizados foram obtidos a partir de plântulas, das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce, micropropagadas através do 1º ciclo de bulbinho *in vitro* e mantidas por 60 dias em meio MS. Os explantes com aproximadamente 20 mm de altura foram inoculados em tubos de ensaio contendo 13ml do meio previamente autoclavado a 120°C por 20 minutos. Utilizou-se o meio de MS(1962), modificado pela adição de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (300 mg/L), sacarose (90 g/L), pH ajustado para 5,9. Foram testados dois tipos de meios: sólido e líquido. No meio sólido utilizou 7,0 g/L de agar e no meio líquido utilizou "pontes" de papel de filtro (Heller, 1949) e os tubos contendo meio foram vedados com tampas plásticas.

Os experimentos foram realizados separadamente para cada cultivar e foram mantidos em estufa incubadora marca FANEM, tipo BOD, com temperaturas ajustadas para 30°C, fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro e 1.500 lux de luminosidade.

Foram avaliados a interação dos meios sólido e líquido com três diferentes diâmetros da base das plântulas (explantes): $P: < 2,0 \text{ mm}$, $M: 2,0 \text{ a } 3,0 \text{ mm}$ e $G: > 3,0 \text{ mm}$, no esquema fatorial, totalizando 6 tratamentos.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com 4 repetições por tratamento e 4 plântulas por parcela, totalizando 16 tubos (plântulas) por tratamento.

Foram realizadas seis avaliações em intervalos de 15 dias, a partir da data de instalação do experimento e foram avaliados os seguintes parâmetros: altura da plântula, diâmetro do bulbinho, diâmetro da haste e taxa de bulbificação (diâmetro do bulbinho dividido pelo diâmetro da haste).

4.4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bulbinhos mais desenvolvidos foram observados no meio sólido suplementado com sacarose (120 g/L), quando se utilizou explantes com diâmetro basal maior que 2,0 mm.

Observa-se para a cultivar Pira Ouro e Pirana Precoce (Tabela 13) que todas as variáveis apresentaram diferenças significativas ($P < 0,01$) para épocas de avaliação. Para 'Pira Ouro' as variáveis altura das plântulas e diâmetro do bulbinho mostraram interações significativas ($P < 0,01$) para meio x avaliação, e para 'Pirana Precoce' o diâmetro de bulbinho e da haste mostraram diferenças significativas com $P < 0,01$, enquanto taxa de bulbificação e altura com $P < 0,05$, para a interação meio x avaliação, sendo que apenas taxa de bulbificação mostrou diferença entre as médias ($P < 0,05$) para a interação diâmetro x avaliação.

Verifica-se para a cultivar Pira Ouro que o aumento ocorrido para o diâmetro da haste e taxa de bulbificação (Figura 18) foram crescentes sendo os maiores valores observados aos 90 dias, sendo esses aumentos explicados pela equação de regressão linear.

TABELA 13. Resumo das análises de variância para diâmetro de bulbinho, diâmetro da haste, taxa de bulbificação e altura das plântulas das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce, obtidos a partir de explantes com diferentes diâmetros, em meio sólido e líquido, no decorrer das avaliações.

F.V.	G.L.	Quadrados médios							
		Pira Ouro				Pirana Precoce			
		Diâmetro (mm)		Taxa de Bulbificação	Altura (mm)	Diâmetro (mm)		Taxa de Bulbificação	Altura (mm)
		Bulbinho	Haste			Bulbinho	Haste		
Bloco	3	26,4927*	0,7330	3,5581**	42,0581	21,5989**	0,5241	1,9809*	44,1879*
Meio (M)	1	230,5336**	9,2517**	12,6143**	365,0010**	230,7867**	5,7200**	17,3750**	296,5858**
Diâmetro (D)	2	56,4259**	3,8301**	1,4132	26,5543	22,0933*	2,2519**	0,2022	46,4976
M x D	2	8,0251	0,5009	0,8177	77,3494	2,7853	0,1817	0,3763	4,2883
Resíduo (a)	15	7,5799	0,5535	0,4749	27,4589	3,7963	0,2861	0,5797	13,4256
Avaliação (A)	5	77,5378**	3,7687**	3,2979**	71,7579**	62,2589**	2,8648**	3,4016**	69,4496**
M x A	5	3,6718**	0,1811	0,1318	3,1558**	5,2907**	0,2399**	0,2252*	1,7142*
D x A	10	0,4022	0,0248	0,0483	1,2213	0,5607	0,0108	0,2099*	1,2881
M x D x A	10	0,8362	0,0934	0,0246	1,3567	0,2128	0,0268	0,0311	0,2213
Resíduo (b)	90	0,7612	0,0886	0,1069	0,7985	0,3862	0,0502	0,0883	0,7283
C.V. (%) (a)		48,150	35,069	26,567	59,983	34,805	25,854	29,007	41,377
C.V. (%) (b)		15,258	14,032	12,603	10,229	11,102	10,831	11,320	9,637

* Significativo ao nível de 5% pelo Teste F;

** Significativo ao nível de 1% pelo Teste F.

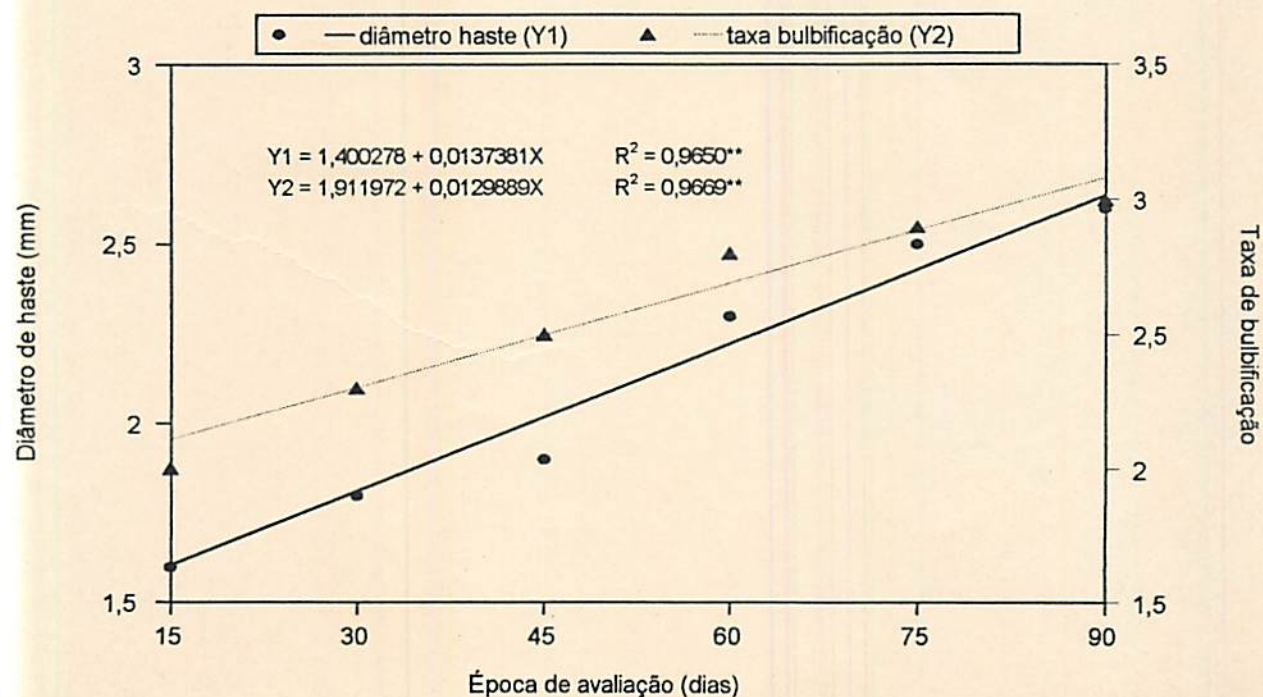


FIGURA 18. Comportamento do diâmetro de haste das plântulas e da taxa de bulbificação da cultivar Pira Ouro no decorrer das avaliações.

Pela Figura 19, verifica-se que houve maior desenvolvimento das plântulas e aumento no diâmetro dos bulbinhos nos dois meios, no decorrer das avaliações. A equação quadrática está explicando o aumento em altura ocorrido nos dois meios, atingindo aos 75 dias a maior altura observada, e a equação linear está explicando o aumento do diâmetro dos bulbinhos, o qual aumentou até aos 90 dias. Para as duas variáveis o meio sólido se mostrou o melhor.

Para a cultivar Pirana Precoce (Figura 20), verifica-se que a equação de regressão linear explica o aumento dos diâmetros da haste e do bulbinho nos dois meios durante as avaliações, e para as duas variáveis o meio sólido foi o melhor. O comportamento da taxa de bulbificação e altura das plântulas é explicado pela equação quadrática (Figura 21) e verifica-se que o meio sólido foi o melhor sendo as maiores médias observadas já aos 60 dias. O comportamento da taxa de bulbificação de bulbinhos provenientes de plântulas com diferentes diâmetros é explicada pela equação de regressão quadrática, onde maior taxa foi observada já aos 60 dias (Figura 22).

Para as duas cultivares, todas as variáveis apresentaram diferenças significativas ($P < 0,01$) para meio, durante as avaliações (Tabela 13) e na última avaliação (Tabela 14). Os diâmetros da haste e do bulbinho mostraram diferenças significativas ($P < 0,01$) para o diâmetro da base da plântula, no decorrer das avaliações (Tabela 13), para as duas cultivares, enquanto na última avaliação, aos 90 dias (Tabela 14), somente o diâmetro do bulbinho para a cultivar Pira Ouro mostrou diferenças estatísticas entre as médias ($P < 0,05$).

Maior desenvolvimento das plântulas tanto durante como na última avaliação foi observado para o meio sólido em comparação ao meio líquido para as duas cultivares.

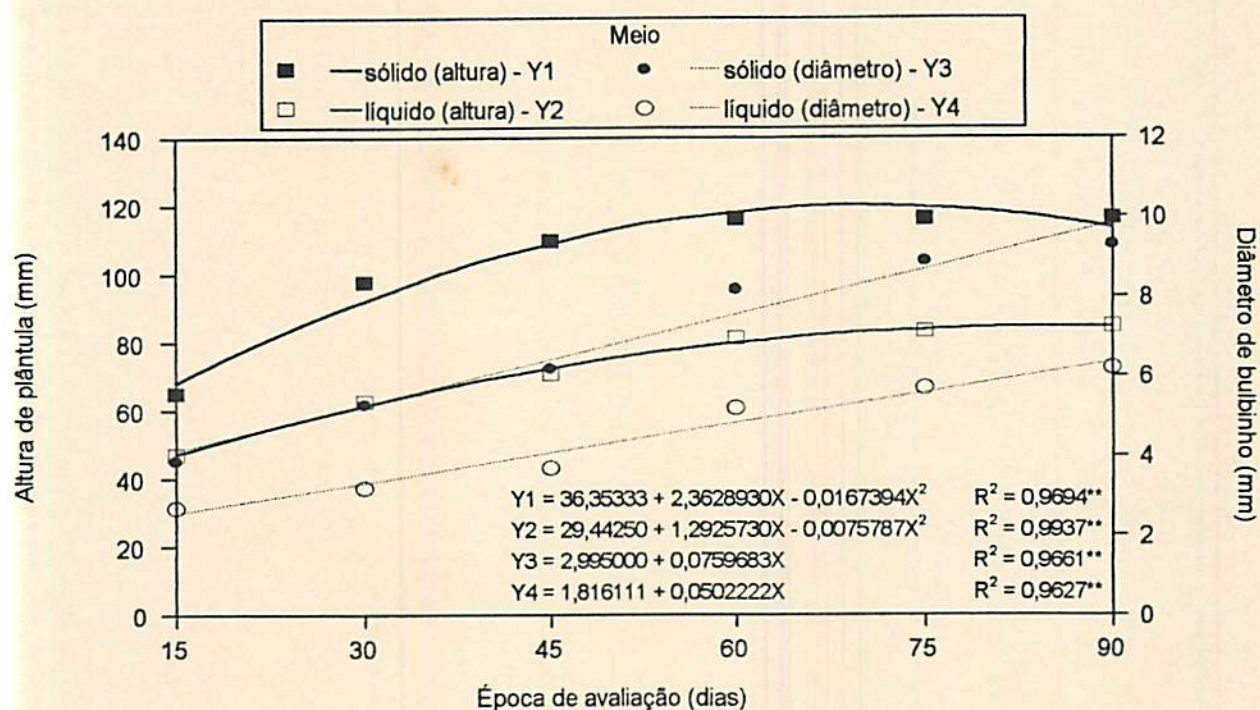


FIGURA 19. Comportamento da altura das plântulas e do diâmetro dos bulbinhos da cultivar Pira Ouro, em meio sólido e líquido, no decorrer das avaliações.

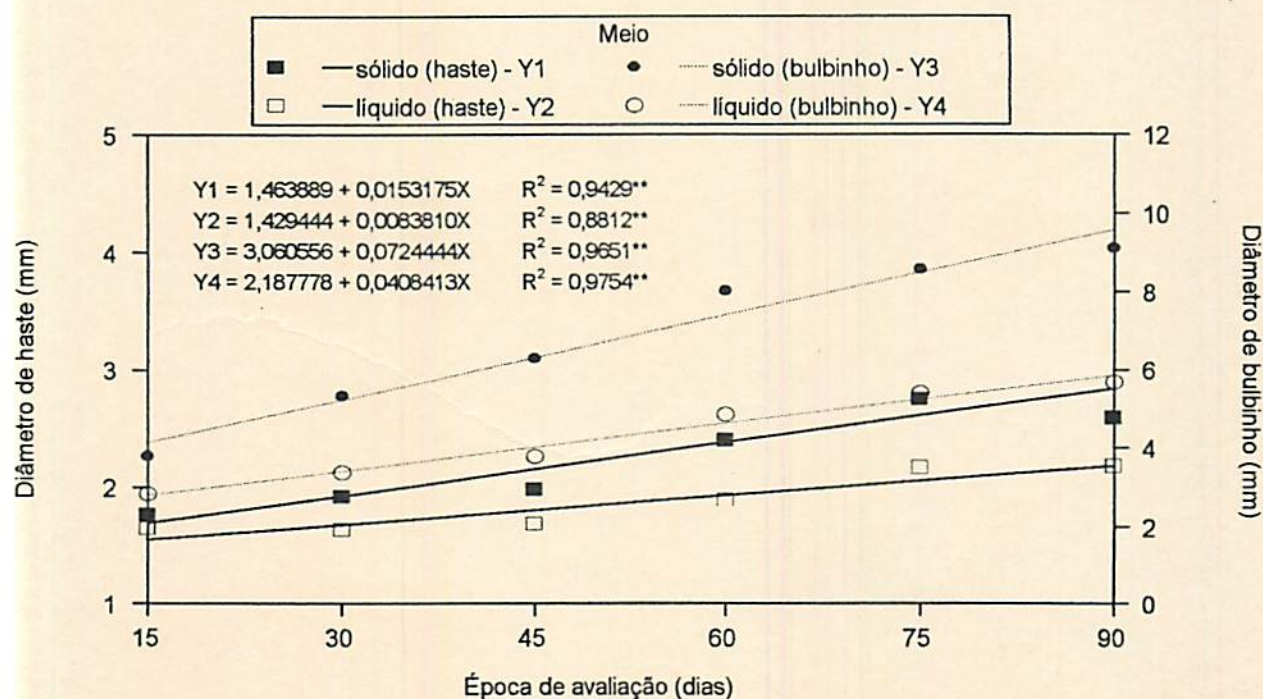


FIGURA 20. Comportamento dos diâmetros das hastes e dos bulbinhos da cultivar Pirana Precoce, em meio sólido e líquido, no decorrer das avaliações.

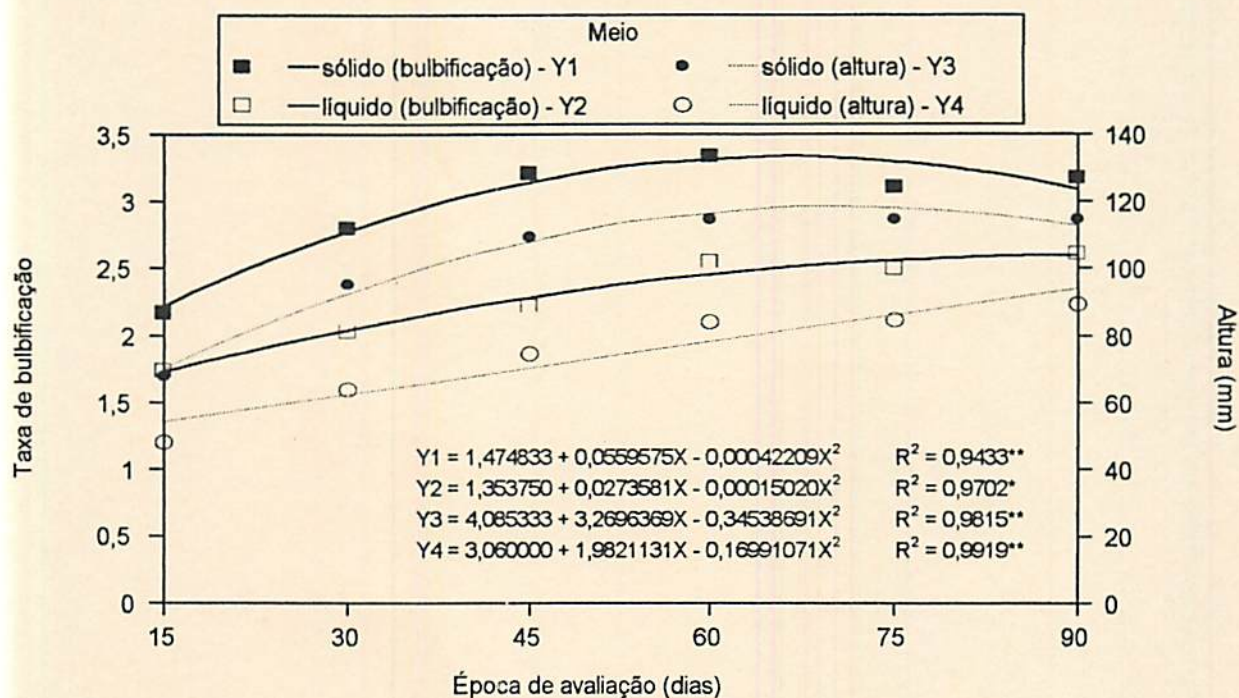


FIGURA 21. Comportamento da taxa de bulbificação e altura das plântulas da cultivar Pirana Precoce, em meio sólido e líquido, no decorrer das avaliações.

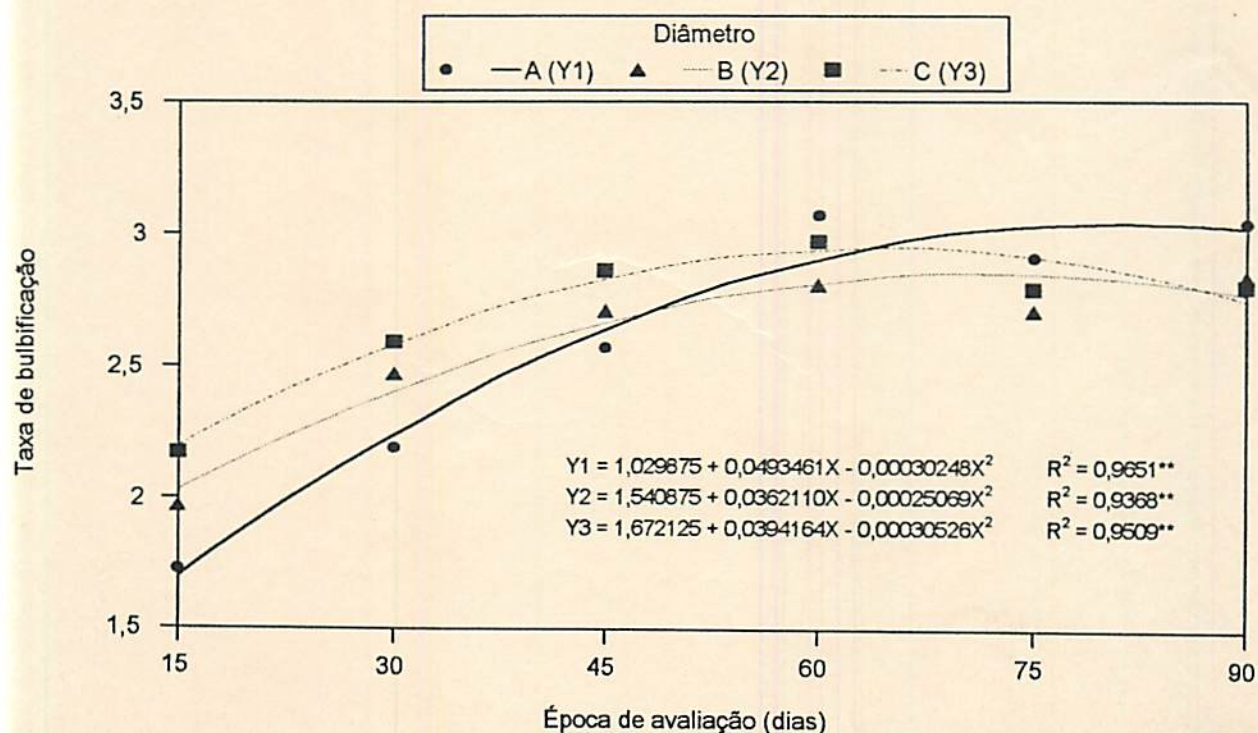


FIGURA 22. Comportamento da taxa de bulbificação de plântulas com diferentes diâmetros basais da cultivar Pirana Precoce no decorrer das avaliações.

TABELA 14. Resumo das análises de variância para diâmetro de bulbinho e da haste, taxa de bulbificação e altura das plântulas das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce, obtidos a partir de explante com diferentes diâmetros, em meio sólido e líquido. Avaliação aos 90 dias.

F.V.	G.L.	Quadrados médios							
		Pira Ouro				Pirana Precoce			
		Diâmetro (mm)		Taxa de Bulbificação	Altura (mm)	Diâmetro (mm)		Taxa de Bulbificação	Altura (mm)
		Bulbinho	Haste			Bulbinho	Haste		
Bloco	3	0,0861	0,0049	1,0548**	11,3607	0,0678*	0,0032	0,2939	12,1507
Meio (M)	1	0,6048**	0,0323**	1,2558*	58,2817**	0,7038**	0,0228**	2,6070**	38,7858**
Diâmetro (D)	2	0,1413*	0,0055	0,4667	7,7967	0,0413	0,0047	0,0808	10,6990
M x D	2	0,0397	0,0039	0,2348	16,2816	0,0088	0,0006	0,1539	2,1966
Resíduo	15	0,0388	0,0024	0,1986	6,6305	0,0152	0,0014	0,1658	3,8840
C.V. (%)		25,411	19,326	14,973	25,720	16,637	15,025	13,849	19,294

* Significativo ao nível de 5% pelo Teste F;

** Significativo ao nível de 1% pelo Teste F.

As médias observadas em meio sólido para diâmetro do bulbinho, da haste, taxa de bulbificação e altura foram diferentes das médias observadas no meio líquido, comprovando assim o efeito marcante do meio sólido pela superioridade das médias observadas.

Segundo Caldas, Haridasan e Ferreira (1990) os bons resultados obtidos por White (1943) com o meio líquido e por Murashige e Skoog (1962) com o meio sólido são explicados pela baixa concentração de sais do meio líquido e alta concentração dos sais do meio sólido, haja visto que a absorção no meio líquido é muito maior. No entanto, os resultados observados sugerem que o meio líquido com alto potencial osmótico dificulta a absorção de nutrientes pelas células, em comparação ao meio sólido, retardando assim o desenvolvimento das plântulas. Melhores resultados poderiam possivelmente ser obtidos no meio líquido, porém em concentrações mais baixas de sacarose.

Com relação ao efeito do diâmetro da base das plântulas observa-se pela Tabela 15, que as maiores médias observadas, na cultivar Pira Ouro, para diâmetro do

bulbino foram 6,85 e 5,61 e da haste foram 2,39 e 2,13 para plântulas originadas do diâmetro G (> 3,0 mm) e M (2,0 a 3,0 mm), respectivamente, os quais não diferiram entre si, tendo o diâmetro G diferido apenas do diâmetro P. Resultados semelhantes, apenas para o diâmetro de bulbino podem ser observados na Tabela 16 (última avaliação), ou seja as maiores médias 9,14 (G) e 7,64 (M) não diferiram entre si, sendo que apenas o diâmetro G diferiu do P ao nível de 5%, ou seja, na última avaliação somente o diâmetro do bulbino foi afetado pelo diâmetro da base do explante, mostrando que num esquema de micropropagação rápida de cebola da cultivar Pira Ouro, melhores resultados poderão ser alcançados quando se utilizarem plântulas mais vigorosas, ou seja com diâmetro da base maior que 2,0 mm e o meio de cultura sólido.

Para a cultivar Pirana Precoce, o efeito do diâmetro da base da plântula foi verificado no decorrer das avaliações (Tabela 15), e apenas o diâmetro G diferiu dos demais com médias 6,83 mm para diâmetro do bulbino e 2,32 para o diâmetro da haste. Aos 90 dias não se observou o efeito marcante do diâmetro do explante para as variáveis analisadas, mostrando que este efeito tende a desaparecer à medida que se prolonga o período de cultivo *in vitro*.

TABELA 15. Influência do diâmetro da base da plântula (explante) sobre o diâmetro do bulbino e diâmetro da haste, das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce, no decorrer das avaliações.¹

Diâmetro da base da plântula*	Pira Ouro		Pirana Precoce	
	Diâmetro (mm)		Diâmetro (mm)	
	Bulbino	Haste	Bulbino	Haste
G	6,85 a	2,39 a	6,83 a	2,32 a
M	5,61 ab	2,13 ab	5,20 b	1,94 b
P	4,69 b	1,83 b	5,21 b	1,95 b

* P = (< 2,0 mm); M = (2,0 mm a 3,0 mm); G = (> 3,0 mm).

¹ Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 16. Influência do diâmetro da base do explante sobre o diâmetro do bulbinho da cultivar Pira Ouro. Avaliação aos 90 dias.¹

Diâmetro da base do explante	Diâmetro Bulbinho
G	9,14 a
M	7,64 ab
P	6,49 b

P = (2,0 mm); M = (2,0 mm a 3,0 mm); G = (>3,0 mm).

¹ Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As avaliações realizadas em intervalos de 15 dias mostraram que a maioria das variáveis analisadas apresentaram um crescimento gradativo até aos 60 dias, tendendo à estabilização até o final das avaliações (90 dias), tornando assim dispensável avaliações em intervalos menores, ou seja, a partir de 15 dias. Esses resultados também mostraram que o processo de bulbificação *in vitro* de cebola teve seu início a partir de 30 dias.

Nas condições do presente experimento o meio sólido propiciou maior desenvolvimento das plântulas e se mostrou mais adequado para a indução de bulbificação, confirmando assim os resultados obtidos por outros autores com cebola (Kahane, Rancillac e de la Serve, 1992; Matsubara e Hihara, 1978; Mohamed-Yasseen e Splittstoesser, 1992; Mohamed-Yasseen, Splittstoesser e Litz, 1993) e com o alho (Mohamed-Yasseen, Splittstoesser e Litz, 1994; Nagakubo, Nagasawa e Ohkawa, 1993; Racca et al., 1989), onde utilizaram o meio sólido no processo de bulbificação *in vitro*.

O comportamento dos bulbinhos obtidos em meio líquido foi semelhante ao observado para o alho, porém em meio sólido (Daniels, 1977 e Câmara, 1988), ou seja, de tamanho reduzido e crescimento lento.

O fator diâmetro da base da plântula (vigor) parece estar relacionado com a cultivar e o tempo de cultivo, pois as plântulas com diâmetros menores também responderam

à bulbificação, porém, dando bulbinhos com diâmetros menores e essas diferenças do diâmetro tenderam a desaparecer durante o período de cultura *in vitro*.

Observa-se pela Figura 23, bulbinhos com diâmetros maiores da cultivar Pira Ouro e Pirana Precoce, desenvolvidos em meio sólido e líquido.

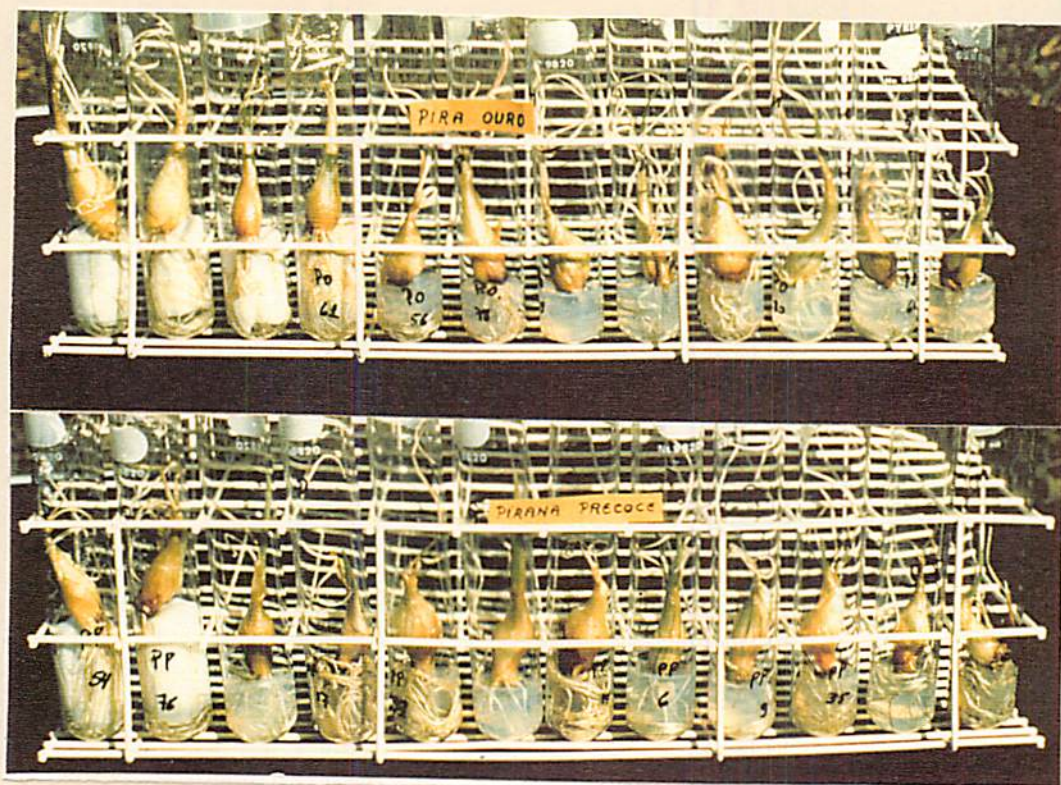


FIGURA 23. Amostra de bulbinhos com maior diâmetro das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce desenvolvidos em meio sólido e líquido.

4.4.4 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, verificou-se que todas as variáveis analisadas nas duas cultivares mostraram melhores respostas para bulbificação no meio sólido, em comparação ao líquido, e para explantes com diâmetro basal maior que 2,0 mm. Num esquema de micropropagação, onde o objetivo é a obtenção de respostas mais rapidamente,

deve-se utilizar o meio sólido, embora o uso do agar acrescido ao meio de cultura, encareça mais o processo.

4.5 EFEITO DE DIFERENTES FOTOPERÍODOS E CONCENTRAÇÕES DE NITROGENIO NA BULBIFICAÇÃO IN VITRO.

4.5.1 OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo estudar o efeito de tres condições de fotoperíodo (8/16, 12/12 e 16/8 horas de luz/escuro) e de três doses de nitrogênio total (60,0; 39,4 e 18,8 mM) na bulbificação *in vitro* da cultivar Pira Ouro.

4.5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado como material vegetal a cultivar Pira Ouro proveniente de plantio realizado em casa-de-vegetação do Departamento de Agricultura, ESAL.

Os explantes foram obtidos de plântulas desenvolvidas em meio de multiplicação de túnicas unidas por segmento basal e mantidas por 40 dias em meio MS (1962). Os explantes com aproximadamente 20,0 mm de altura foram inoculados em tubos de ensaio previamente autoclavados, contendo 13,0 ml do meio MS (1962) modificado pela adição de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (300 mg/L), nitrogênio total nas concentrações de 60,0; 39,4 e 18,8 mM (Tabela 17), sacarose (120 g/L), agar (7,0 g/L) e pH ajustado para 5,9.

O experimento foi mantido em estufa incubadora tipo BOD, marca FANEM, com temperatura ajustada para 30°C e fotoperíodos de 8/16, 12/12 e 16/8 horas de luz/escuro e 1.500 lux de luminosidade.

TABELA 17. Concentrações de NH_4 , NO_3 , Nitrogênio Total em mM, relação NO_3/NH_4 e taxa de NO_3/NH_4 na indução de bulbificação *in vitro* de cebola.

Tratamento	NO_3 (mM)	NH_4 (mM)	Nitrogênio Total (mM)	Relação NO_3/NH_4	Taxa NO_3/NH_4
A	39.4	20.6	60.0	1.91	2:1
B	29.1	10.3	39.4	2.83	3:1
C	18.8	0,0	18.8	0,00	1:0

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com 4 repetições por tratamento, 3 condições de fotoperíodo combinadas com 3 diferentes doses de nitrogênio, no esquema fatorial, constituindo 9 tratamentos, e com parcelas representadas por 6 plântulas.

Foram realizadas quatro avaliações em intervalos de 15 dias a partir da data de inoculação, avaliando-se os seguintes parâmetros: altura das plântulas, diâmetro do bulbinho, diâmetro da haste, taxa de bulbificação e número de raízes. Os dados obtidos para número de raízes foram transformados para $\sqrt{X}$.

4.5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se para a cultivar Pira Ouro (Tabela 18), que durante as avaliações as variáveis diâmetro da haste, taxa de bulbificação, altura das plântulas e número de raízes mostraram diferenças significativas ($P < 0,01$) para a interação avaliação x fotoperíodo, indicando que essas variáveis apresentaram respostas diferentes para fotoperíodo e essas respostas variaram ao longo das avaliações.

TABELA 18. Resumo das análises de variância para diâmetro de bulbinho e da haste, taxa de bulbificação, altura das plântulas e número de raízes dos bulbinhos da cultivar Pira Ouro, obtidos em diferentes fotoperíodos com três níveis de nitrogênio, no decorrer das avaliações.

F.V.	G.L.	Quadrados Médios				
		Diâmetro		Taxa Bulbi- ficação	Altura	Número Raízes ¹
		Bulbinho	Haste			
Bloco	3	5,1897**	0,1788	4,5302	33,4812**	0,8601**
Fotoperíodo (F)	2	10,0311**	0,5746**	15,1877**	37,5804**	1,5968**
Nitrogênio (N)	2	0,9576	0,0136	0,0926	1,5580	0,2374
F x N	4	0,4950	0,0698	0,0967	1,8317	0,1092
Resíduo	24	0,9668	0,1016	0,4427	4,1791	0,1324
Avaliação (A)	3	38,7886**	1,5601**	3,5909**	24,8603**	0,7856**
A x F	6	0,2591	0,0553**	0,4093**	1,0168**	0,0395**
A x N	6	0,1247	0,0170	0,0439	0,1765	0,0073
A x F x N	12	0,0249	0,0074	0,0427	0,0865	0,0070
Resíduo (b)	82	0,1178	0,0124	0,1024	0,1818	0,0093
C.V. (%) (a)		21,586	21,998	20,950	39,752	19,188
C.V. (%) (b)		7,535	7,694	10,077	8,291	5,075

¹ Dados transformados para $\sqrt{X}$.

** Significativo ao nível de 1% pelo Teste F.

Verifica-se que quanto maior o fotoperíodo, maior também foram as médias observadas para taxa de bulbificação e número de raízes (Figuras 24 e 25) e menores foram as médias do diâmetro da haste e altura das plântulas (Figuras 26 e 27), respectivamente.

A variável diâmetro do bulbinho apresentou diferença significativa ($P < 0,01$) para épocas de avaliação (Figura 28), e fotoperíodo (Figura 29), sendo que o maior diâmetro foi observado no fotoperíodo de 16/8 horas de luz e escuro e no final das avaliações, ou seja, quanto maior o fotoperíodo e o tempo de cultivo, maior também foram os diâmetros dos bulbinhos sendo o aumento do diâmetro ocorrido durante as avaliações explicado pela equação de regressão linear.

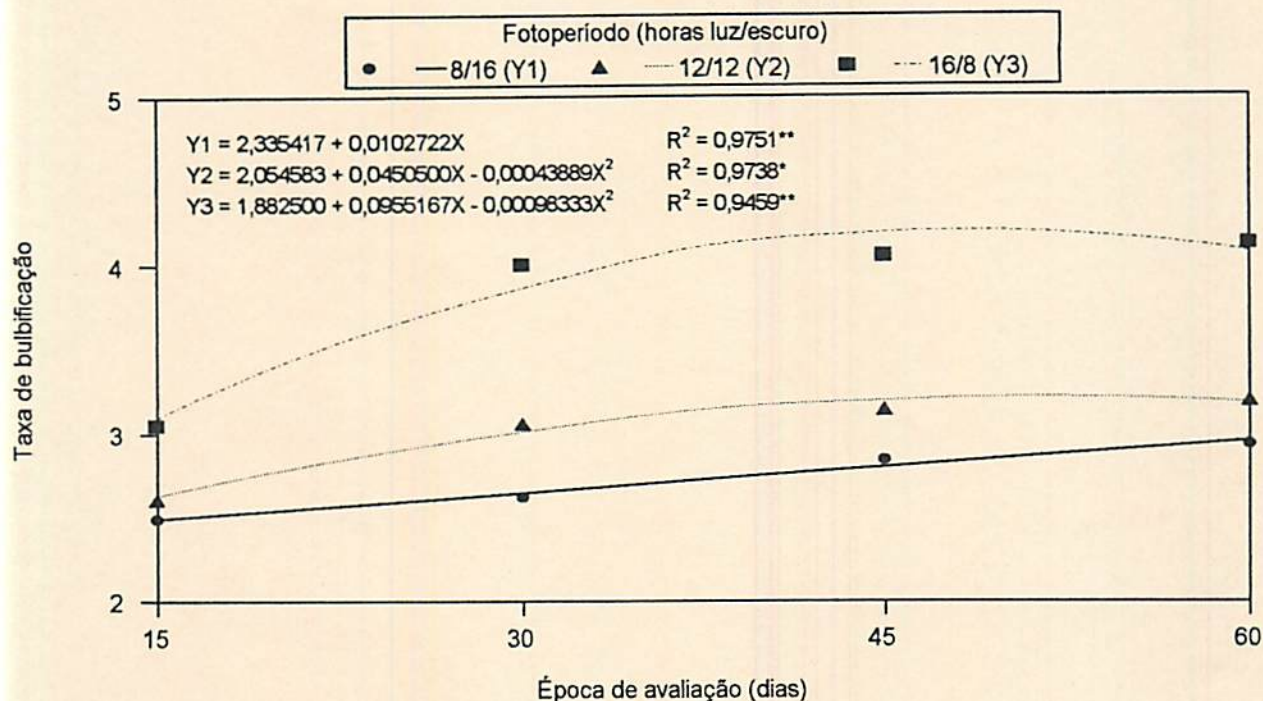


FIGURA 24. Comportamento da taxa de bulbificação das plântulas da cultivar Pira Ouro, em diferentes fotoperíodos, no decorrer das avaliações.

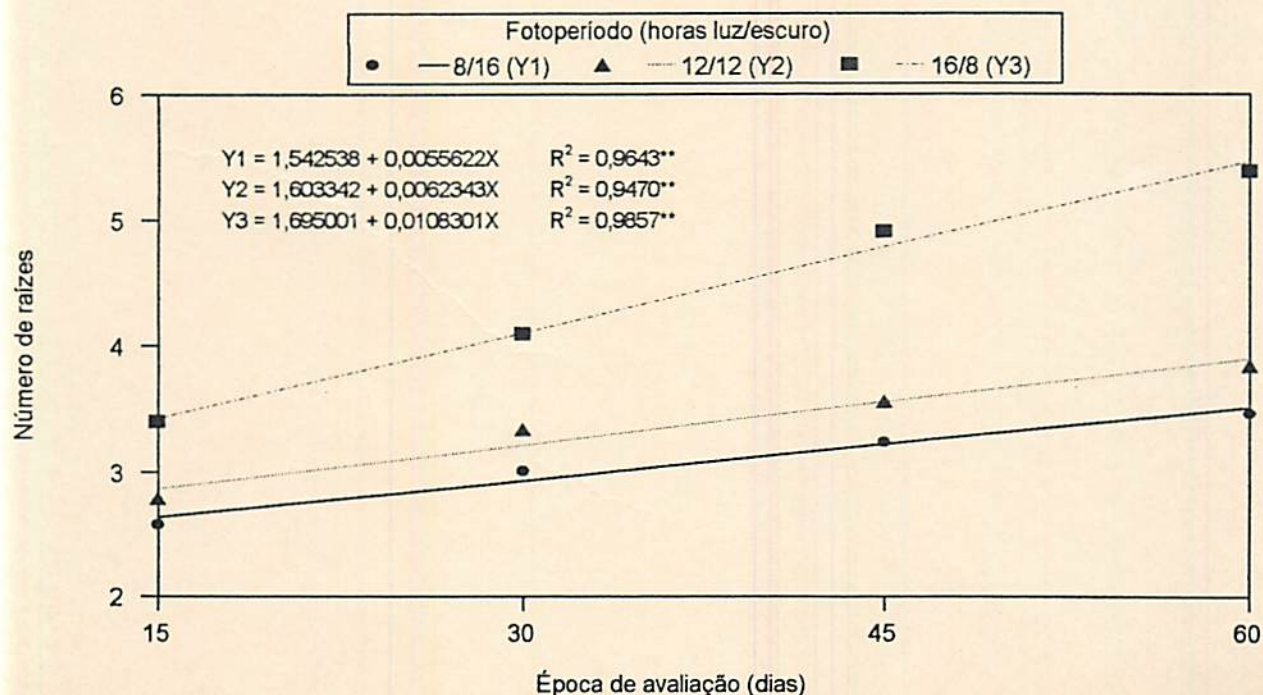


FIGURA 25. Número de raízes das plântulas da cultivar Pira Ouro, em diferentes fotoperíodos, no decorrer das avaliações.

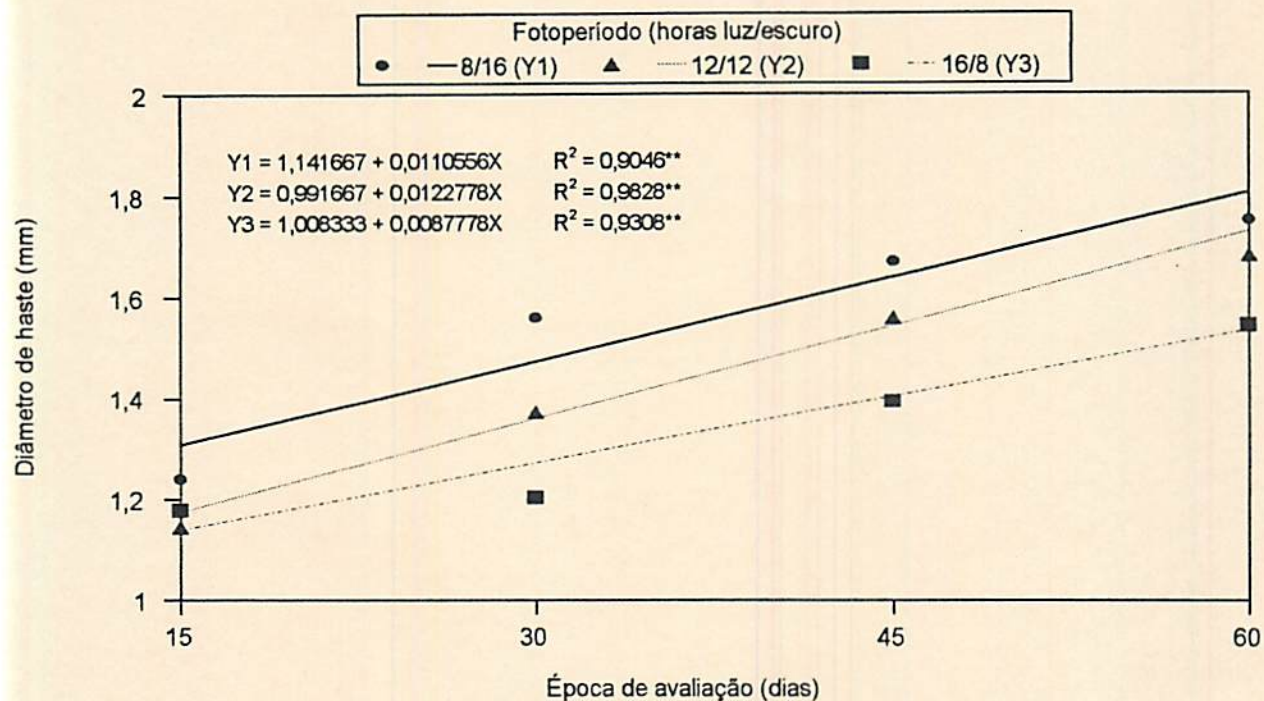


FIGURA 26. Comportamento do diâmetro da haste de plântulas da cultivar Pira Ouro, em diferentes fotoperíodos, no decorrer das avaliações.

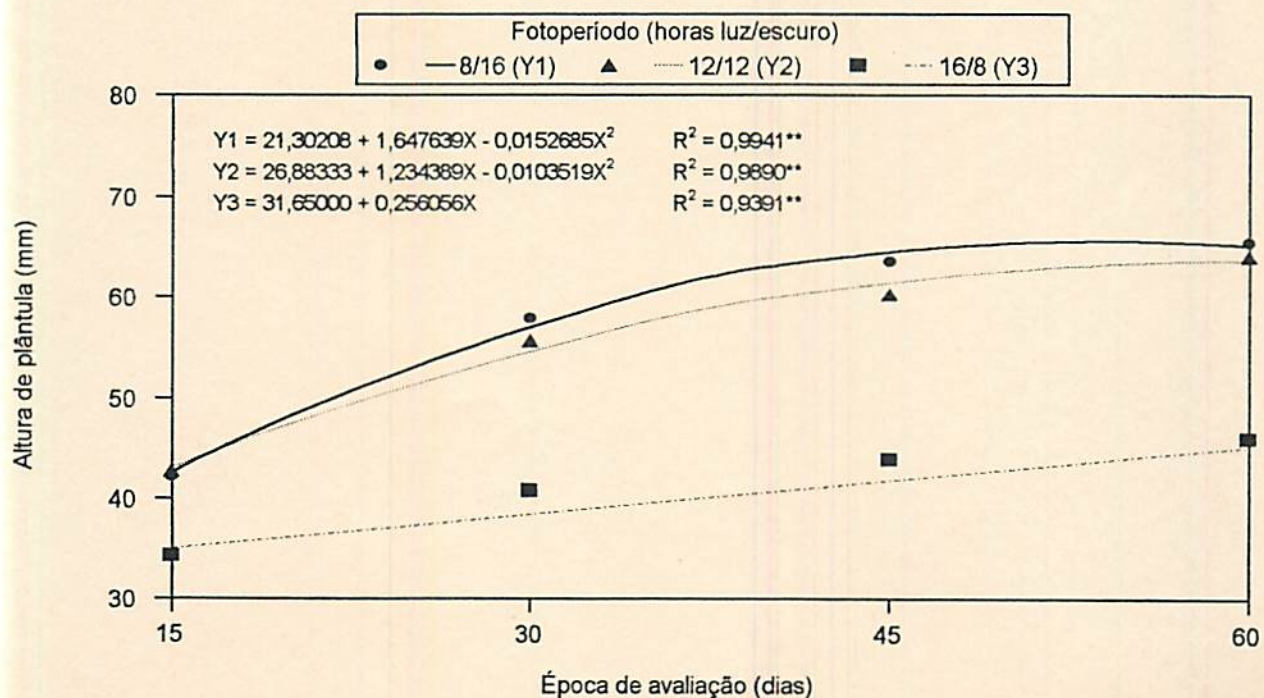


FIGURA 27. Comportamento da altura das plântulas da cultivar Pira Ouro, em diferentes fotoperíodos, no decorrer das avaliações.

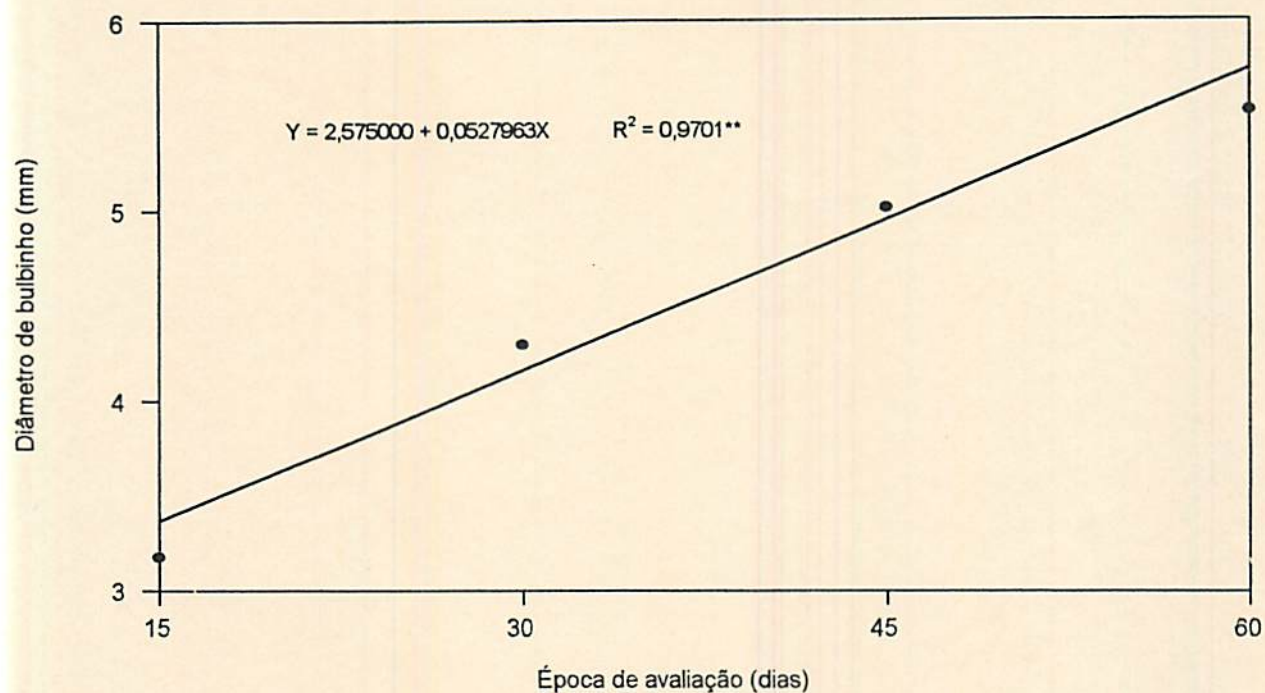


FIGURA 28. Comportamento do diâmetro dos bulbinhos das plântulas da cultivar Pira Ouro no decorrer das avaliações.

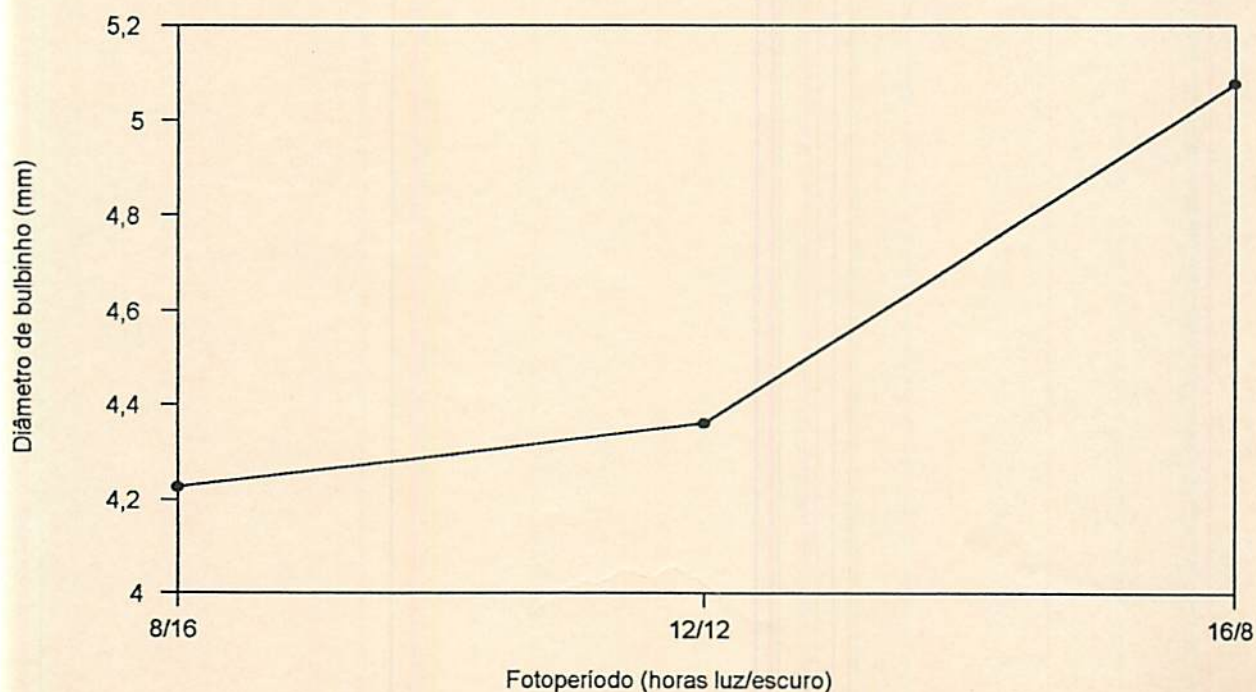


FIGURA 29. Comportamento do diâmetro dos bulbinhos das plântulas da cultivar Pira Ouro, em função de diferentes fotoperíodos.

Nas condições do presente experimento as variáveis diâmetro do bulbinho e da haste, taxa de bulbificação, altura das plântulas e número de raízes apresentaram um comportamento crescente dentro de épocas de avaliação, sendo as melhores respostas para bulbificação observada no final das avaliações, ou seja, aos 60 dias.

Para as avaliações realizadas aos 60 dias (Tabela 19) com exceção do diâmetro da haste, as demais variáveis apresentaram diferenças entre as médias ($P < 0,01$), mostrando o efeito dos fotoperíodos. Na Figura 30 verifica-se o aumento do diâmetro dos bulbinhos e da taxa de bulbificação, sendo o maior diâmetro e a maior taxa de bulbificação observados no fotoperíodo de 16/8 horas de luz e escuro.

Na Figura 31, observa-se que nos fotoperíodos 8/16 e 12/12 horas de luz e escuro, maior foi o desenvolvimento das plântulas causado provavelmente pelo estiolamento da parte aérea e esse desenvolvimento mostrou um comportamento decrescente de 12 para 16 horas de luz, enquanto para número de raízes, um comportamento crescente foi observado de 12 para 16 horas de luz.

Os resultados obtidos nas Tabelas 18 e 19 sugerem que, para as condições deste experimento, o efeito das diferentes concentrações de nitrogênio não foram detectadas, embora se tenha conhecimento que o nitrogênio, além do fotoperíodo e temperatura, exerça um papel importante no processo de bulbificação de cebola.

Em condições de campo a cebola necessita de um nível ótimo de nitrogênio para maximizar a produção e a performance da cultura, (Brewster e Butler, 1989; Smittle, 1984; Vavrina e Granberry, 1988), provavelmente os níveis de 39,4 e 18,8 mM para as condições *in vitro* estão abaixo dos níveis ótimos de nitrogênio exigido pela cultura, fato este que pode ser observado pelas médias mostradas da Tabela 20.

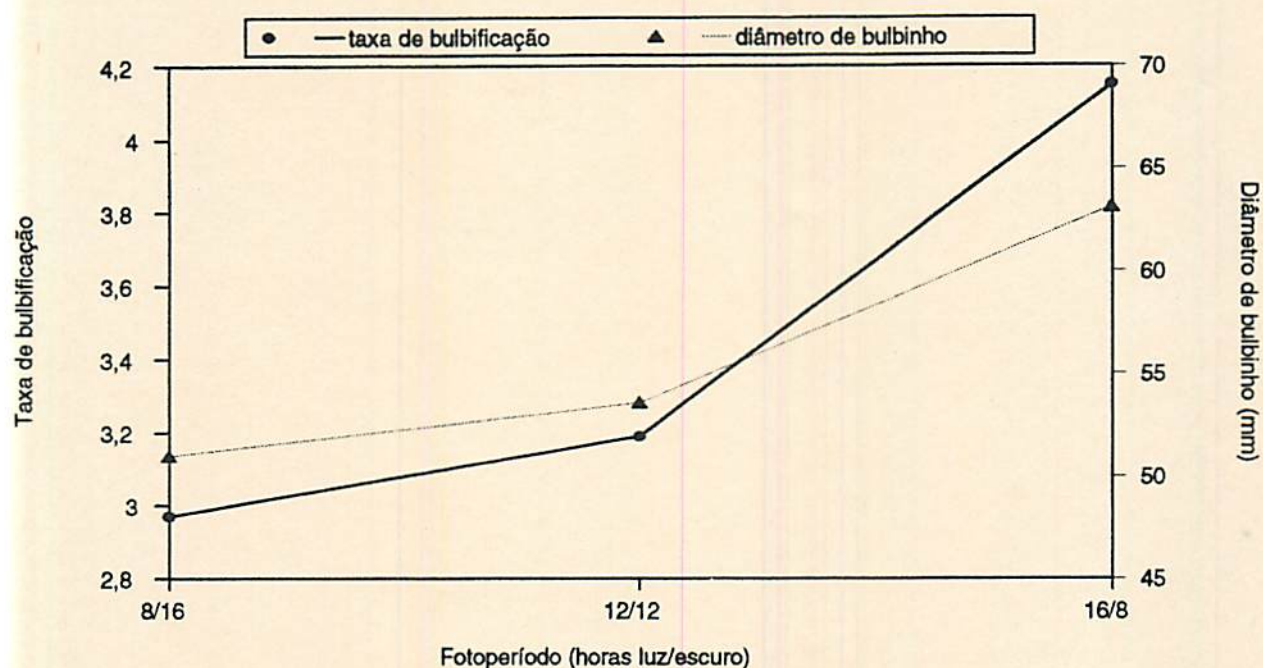


FIGURA 30. Comportamento do diâmetro dos bulbos e taxa de bulbificação da cultivar Pira Ouro, em função de diferentes fotoperíodos. Avaliação aos 60 dias.

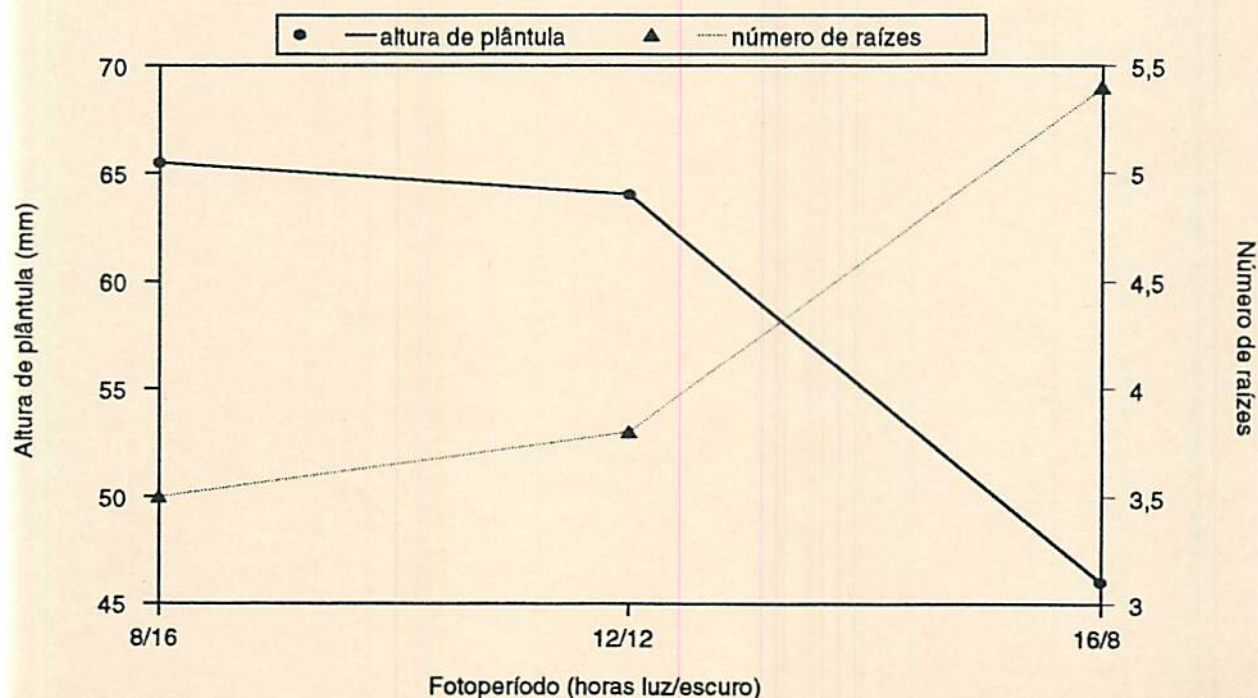


FIGURA 31. Número de raízes e altura das plântulas da cultivar Pira Ouro, em função de diferentes fotoperíodos. Avaliação aos 60 dias.

TABELA 19. Resumo das análises de variância para diâmetro de bulbinho e da haste, taxa de bulbificação, altura das plântulas e número de raízes dos bulbinhos da cultivar Pira Ouro, obtidos em diferentes fotoperíodos com três níveis de nitrogênio. Avaliação aos 60 dias.

F.V.	G.L.	Quadrados Médios				
		Diâmetro		Taxa Bulbi-ficação	Altura	Número de Raízes ¹
		Bulbinho	Haste			
Bloco	3	2,4078*	0,0560	1,4852**	11,4682**	0,3050**
Fotoperíodo (F)	2	4,8531**	0,1230	4,7695**	14,0507**	0,6977**
Nitrogênio (N)	2	0,4434	0,0189	0,0007	0,5840	0,0709
F x N	4	0,2393	0,0541	0,1192	0,8404	0,0205
Resíduo	24	0,5168	0,0477	0,2295	1,5070	0,0452
CV (%)		12,854	13,199	13,932	20,967	10,382

¹ Dados transformados para $\sqrt{X}$.

* Significativo ao nível de 5% pelo Teste F.

** Significativo ao nível de 1% pelo Teste F.

TABELA 20. Efeito das doses de nitrogênio total sobre as médias do diâmetro de bulbinho e da haste, taxa de bulbificação, altura das plântulas e número de raízes da cultivar Pira Ouro. Avaliação realizada aos 60 dias.

Nitrogênio (mM)	Diâmetro		Taxa Bulbi-ficação	Altura	Número de Raízes
	Bulbinho	Haste			
60,0	6,32	1,70	3,44	60,25	4,26
39,4	5,49	1,64	3,44	59,47	3,63
18,8	5,47	1,63	3,43	56,04	4,31

Apesar de não ter ocorrido diferenças entre as médias para doses de nitrogênio, observa-se pela Tabela 20, que a dose equivalente a 60 mM de nitrogênio total, mostrou médias mais elevadas para todas as variáveis analisadas, discordando portanto dos resultados observados para o alho por Câmara (1988), onde um pequeno aumento no

diâmetro de bulbilhos de alho foi verificado à medida que as concentrações de nitrogênio foram sendo reduzidas e por Teixeira (1989), onde em menores níveis de nitrogênio maior foi o número de minitubérculos de batata/frasco da cultivar Bintje.

Embora as maiores médias tenham sido observadas em 60 mM de nitrogênio total, correspondendo à taxa de 2:1 (NO_3NH_4), esta taxa não diferiu de 3:1 e 1:0, concordando portanto com os resultados observados por Gamiely et al. (1991), onde também não se verificou diferenças entre as médias para 1:0 e 3:1 (NO_3NH_4).

A cebola é uma cultura que em condições naturais exige um fotoperíodo crítico para bulbificar. Em temperaturas mais elevadas o fotoperíodo crítico diminui e ocorre a bulbificação precoce dando bulbos menores, enquanto em temperaturas mais baixas o fotoperíodo crítico aumenta, levando a uma bulbificação mais tardia e a ocorrência da formação de charuto (Maluf, 1992). No presente experimento o processo de bulbificação foi observado nos três fotoperíodos, sendo que no fotoperíodo menor (8/16 horas de luz e escuro) na temperatura de 30°C, os bulbinhos apresentaram menores médias (5,10 mm).

Observa-se na Figura 32, o comportamento de bulbinhos da cultivar Pira Ouro, desenvolvidos em três condições de fotoperíodo e três níveis de nitrogênio A (60,0 mM), B (39,4mM) e C (18,8 mM).

4.5.4 CONCLUSÕES

Dentre os fotoperíodos testados para indução de bulbificação *in vitro* de cebola, para a cultivar Pira Ouro, o fotoperíodo de 16/8 horas de luz e escuro na temperatura de 30°C foi o que mostrou melhores resultados, apresentando maior taxa de bulbificação, com menor diâmetro da haste, maior diâmetro do bulbinho, menor altura e maior número de raízes,

enquanto que para Nitrogênio, não se observou diferença entre as médias nas doses utilizadas, para todas as variáveis analisadas.

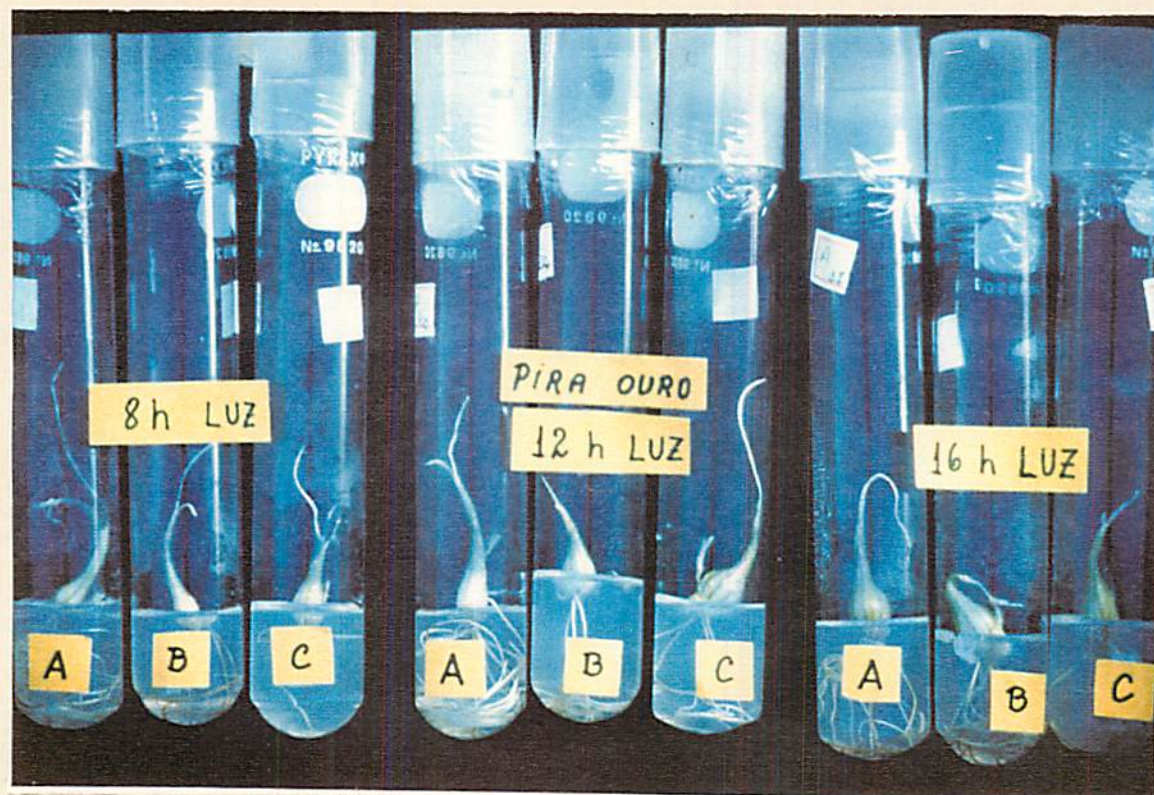


FIGURA 32. Bulbinhos da cultivar Pira Ouro desenvolvidos em três condições de fotoperíodo e três níveis de nitrogênio A (60,0 mM), B (39,4 mM) e C (18,8 mM). Avaliação aos 60 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREW, W.T. Vegetative reproduction of onions by the headset method. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, v. 58, p.208-212, Dez. 1951.
- BARKER, A.V.; MILLS, H.A. Ammonium and nitrate nutrition of horticultural crops. *Hort Rev.*, n.2, p.395-423, 1980.

- BREWSTER, J.L.; BUTLER, H.A. Effects of nitrogen supply on bulb development in onion *Allium cepa* L. **Journal of Experimental Botany**, Alexandria, v.40, n.219, p.1155-1162, Oct. 1989.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA - CNPH, 1990. p.37-69.
- CÂMARA, F.A.A. **Obtenção de plantas de alho (*Allium sativum* L.) a partir de meristemas e microbulbificação *in vitro***. Lavras: ESAL, 1988. 55p. (Tese - Mestrado em Fitotecnia).
- DANIELS, J. **Regeneração de clones de alho (*Allium sativum* L.) infectados por um Potyvirus**. Brasília: UNB, 1977. 56p. (Tese - Mestrado em Fitotecnia).
- EWING, E.E. Cuttings as simplified models of the potato plant. In: LI, P.H. **Potato Physiology**, London, Academic Press, 1985. p.153-207.
- GAMIELY, S.; RANDLE, W.M., MILLS, H.A. E SMITTLE, D.A. Onion Plant Growth, Bulb Quality, and Water Uptake following Ammonium and Nitrate Nutrition. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n.8, p.1061-1063, Aug. 1991.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA - CNPH, 1990. p.99-169.
- HELLER, R. Sur l'emploi de papier filtre sans cendres comme support pour les cultures de tissus végétaux. **Conipt. Rend. Soc. Biology**, v.143, p.335-337, 1949.
- HUSSEY, G. In vitro propagation of the onion *Allium cepa* by axillary and adventitious shoot proliferation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.9, p.227-236, 1978.
- ILLG, R.D.; SIQUEIRA, W.J. Variação somaclonal em alho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.12, n.142, p.12-17, 1986.
- ILLG, R.D.; SIQUEIRA, W.J.; SONDAHL, M.R.; LISBÃO, R.S.; FORNASIER, J.B.; DALLACQUA, A.N.; SILVEIRA, T.J. A cultura de tecidos como estratégia para o melhoramento de alho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 23, Rio de Janeiro, 1983. **Resumos...** Rio de Janeiro, 1983. 125p.
- KAHANE, R.; RANCILLAC, M.; DE LA SERVE, B.T. Long-term multiplication of onion (*Allium cepa* L.) by cyclic shoot regeneration in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 28, p.281-288, 1992.
- KELLER, E.R.J. Sucrose, cytokinin, and ethylene influence formation of in vitro bulblets in onion and leek. **Genetic Resource and Crop Evolution**, Gatersleben, v.40, n.2, p.113-120, 1993.
- MAGALHÃES, J.R. Nutrição mineral do alho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.12, n.148, p.20-30, Out. 1986.

- MALUF, W.R. **Melhoramento de Hortalças**. Lavras: ESAL, 1992. (Notas de Aula).
- MATSUBARA, S.; HIRARA, H. Onion bulblet regeneration on receptacles in vivo and in vitro. **Journal Japanese Society Horticultural Science**. v.46, n.4, p.479-486. 1978.
- MOHAMED-YASSEEN, Y.; SPLITTSTOESSER, W. Regeneration of onion (*Allium cepa* L.) bulb in vitro. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v.20, p.76-82. 1992.
- MOHAMED-YASSEEN, Y.; SPLITTSTOESSER, W.; LITZ, R.E. In vitro bulb formation and Plant Recovery from Onion Inflorescences. **HortScience**, Alexandria, v.28, n.10, p.1052. 1993.
- MOHAMED-YASSEEN, Y.; SPLITTSTOESSER, W.; LITZ, R.E. In vitro shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.36, p.243-247, 1994.
- MOSELLA, CH.L.; FERNANDEZ, M.R. Il cultivo *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.) tipo rosado. **Simiente**, Santiago, v.55, n.1/2, p.60-63, Ene/Jun. 1985.
- NAGAKUBO, T. NAGASAWA, A.; OHKAWA, H. Micropropagation of garlic through *in vitro* bulblet formation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.32, p.175-183, 1993.
- NOME, F.; ABRIL, A.; RACCA, R. Obtención de plantas de ajo (*Allium sativum* L.) libres de virus mediante el cultivo de meristemas apicales. **Phyton**, Buenos Aires, v.41, p.139-151, 1981.
- ORGANIZATION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION. **Manual de Intercambio y Propagación de Germoplasma de Ajo a través de microbulbillos**. Santiago, 1991. 45p.
- RACCA, R.W. La microbulbificación sincronizada *in vitro* en ajos de sanidad controlada; un paso esencial en la transferencia a tierra. In: CURSO/TALLER SOBRE PRODUCCIÓN, COMERCIALIZACIÓN E INDUSTRIALIZACIÓN DE AJO, Mendoza, 1989. **Primeiro...** Mendonza: INTA-EEA, 1989. p.
- RACCA, R.W. et al. Microbulbificación *in vitro* en ajos de sanidad controlada. In: CONGRESO ARGENTINO DE HORTICULTURA, 12. Santa Fé, 1989. **Resumen 48**, Santa Fé, 1989. p.
- 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, Jan. 1972.
- SANTELITH, G.; EWING, E.E. Effects of nitrogen fertilization on growth and development of potatoes. **American Potato Journal**, Orono, v.58, n.10, p.517-518, Oct. 1981.

- SLABBERT, M.M.; BRUYN, M.H.; FERREIRA, D.I. PRETORIUS, J. Regeneration of bulblets from twin scales of *Crinum mocowanii* *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.33, p.133-141, 1993.
- SMITTLE, D.A. Responses of onions to sulfur and nitrogen fertilization. **Georgia Agr. Expt. Sta. Res. Rpt. 445**. 1984.
- SYPIEN, M.J.; SMOTER, J.; KEPKOWA, A.; KOWOSIELSKI, O. The influence of nitrogen fertilization on onion quality and storage. **Acta Hort Culture**. v.24, p.341-347, 1973
- TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differential and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.48, p.121-125, 1980.
- THOMAS, T.H. Notes and Comments stimulation of onion bulblet production by N6-Benzyladenine. **Horticultural Research**, Edinburgh, v.12, n.1, p.77-79, May. 1972.
- TEIXEIRA, D.M.C. **Influência do N, Sacarose e Bap e idade da plântula sobre a minituberização de batata (*Solanum tuberosum* L. cv Bintje) *in vitro***. Lavras: ESAL, 1989. 55p. (Tese - Mestrado em Fitotecnia).
- TEIXEIRA, D.M.C.; PINTO, J.E.B.P. Minituberização em diferentes níveis de N, Sacarose e BAP. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.3, n.2, p.77-81, 1991.
- VAUGHAN, E.K.; CROPSEY, M.G.; HOFFMAN, E.N. Effects of field-curing practices, artificial drying, and other factors in the control of neck rot in stored onions. **Oregon State Univ. Agr. Expt. Sta. Tech. Bul. 77**. 1964
- VAVRINA, C.S.; GRANBERRY, D. Dry bulb onions: Commercial vegetable production. **University of Georgia Coop. Ext. Circular 801**. 1988.

5 REGENERAÇÃO DE PLÂNTULAS A PARTIR DE BULBINHOS INDUZIDOS *IN VITRO*

RESUMO

Visando determinar uma metodologia para multiplicação a partir de bulbinhos induzidos *in vitro*, foram avaliados a influência do BAP x ANA, a influência da concentração de sacarose de origem dos bulbinhos e o diâmetro dos bulbinhos sobre a taxa de multiplicação *in vitro*.

Maior taxa de multiplicação para Pira Ouro e Pirana Precoce foram observadas em BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L).

Maior frequência de regeneração e maior taxa de multiplicação foram observados em bulbinhos desenvolvidos em 120 g/L de sacarose tanto para a cultivar Pira Ouro quanto para o Híbrido-120.

Na cultivar Pira Ouro apesar de não se observar diferenças estatísticas entre as médias para porcentagem de regeneração e número de brotos por bulbinhos, os bulbinhos com diâmetros G e M apresentaram maiores médias. Em Pirana Precoce maior porcentagem de regeneração foram observadas nos diâmetros M (86,44%) e P (78,43%), enquanto maior número de brotos por bulbinhos foi observado no diâmetro M (15,44).

5.1 REFERENCIAL TEÓRICO

Através das técnicas de cultura de tecidos, a manutenção e multiplicação rápida de plantas macho-estéreis, bem como de outras linhas melhoradas, poderiam ser altamente vantajosas para um programa de melhoramento genético de cebola.

O processo de multiplicação por um único ciclo através de bulbo adulto tem sido descrito com sucesso por alguns autores (Hussey, 1978; Fujieda, Matsuoka e Fujita, 1979).

Uma rápida propagação *in vitro* pode ser obtida pela formação de brotos adventícios a partir de tecido de disco basal e subsequentemente a partir desses brotos divididos longitudinalmente. No entanto, existem alguns fatores como a formação de bulbinho, a dormência das plântulas utilizadas como explantes e a diminuição na habilidade de regeneração ou taxa de multiplicação que tomam limitantes a micropropagação em cebola (Hussey e Falavigna, 1980).

É sabido que o efeito de fitorreguladores do grupo das auxinas, como ANA, é muito dependente do genótipo que está sendo utilizado. Hussey e Falavigna (1980), trabalhando com explantes secundários das cultivares Senshyu, Yellow Express e W3, observaram que Senshyu, na ausência de ANA, apresentou maior número de brotos, enquanto que 2,0 mg/L mostrou efeito inibitório. A cultivar W3 mostrou efeito contrário a Senshyu, ou seja, em 2,0 mg/L apresentou um grande número de brotos e na ausência de ANA um baixo número de brotos, mostrando ser altamente dependente desta auxina. Para a cultivar Yellow Express não se observou o efeito de ANA em concentrações que variaram de 0 a 16 mg/L.

Kahane, Rancillac e de la Serve (1992) citam que o sucesso na multiplicação por vários ciclos pode ser obtido através da indução de bulbificação *in vitro* seguida da indução de brotações a partir de plântulas regeneradas de bulbo.

5.2 OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do BAP x ANA na taxa de multiplicação de bulbinhos desenvolvidos em diferentes concentrações de sacarose e o efeito do diâmetro sobre a resposta morfogênica de bulbinhos obtidos *in vitro*.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Efeito de BAP x ANA na micropropagação a partir de bulbinhos obtidos *in vitro*

Bulbinhos das variedades Pira Ouro e Pirana Precoce, desenvolvidos em meio contendo 60 g/L de sacarose em duas condições de temperaturas (25 e 30°C), com aproximadamente 90 dias *in vitro*, foram seccionados a 5 mm da base, divididos no sentido longitudinal, destruindo-se o broto principal, obtendo-se 2 segmentos, os quais foram utilizados como explantes secundários.

Estes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 13,0ml do meio de cultura MS (1962), modificado pela adição de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ (300 ml/L), sacarose 30 g/L, as seguintes combinações de BAP x ANA (mg/L): 2,0 x 0,25; 2,0 x 0,5; 4,0 x 0,25 e 4,0 x 0,5, respectivamente, agar (7,0 g/L) e pH ajustado para 5,9. Este meio foi previamente esterilizado em autoclave horizontal a 1 atmosfera de pressão e 120°C durante 20 minutos.

Visando determinar a influência da posição do explante, estes foram colocados em duas posições: horizontal e vertical.

5.3.2 Micropropagação através de bulbinhos desenvolvidos em meios com diferentes concentrações de sacarose

Os bulbinhos da cultivar Pira Ouro e H-120 com 6 meses de idade e desenvolvidos em quatro concentrações de sacarose (30, 60, 90 e 120 g/L) foram seccionados no sentido transversal, a 5mm da base, e posteriormente no sentido longitudinal, destruindo-se o broto principal, obtendo-se dois segmentos os quais foram utilizados como explantes secundários. Estes foram cultivados em tubos de ensaio contendo aproximadamente 13 ml do meio MS (1962) previamente esterilizado e modificado pela adição de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (300 mg/L), sacarose (30 g/L), BAP (2,0 mg/L) e ANA (0,25 mg/L). Após ajustado o pH para 5,9 adicionou-se o agar (7,0 g/L).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 3 repetições por tratamento e com parcelas constituídas por quatro explantes, sendo os tratamentos representados por bulbinhos desenvolvidos em 30, 60, 90 e 120 g/L de sacarose.

5.3.3 Influência do tamanho do bulbinho na frequência de regeneração *in vitro*

Bulbinhos obtidos *in vitro* do experimento Consistência do Meio e Diâmetro das plântulas (Capítulo 4), das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce foram classificados de acordo com o diâmetro em P (< 5 mm), M (5 a 10 mm) e G (> 10 mm) (Figura 33) e utilizados para a instalação do experimento. Nesses bulbinhos foram avaliados peso da matéria fresca e seca, número de túnicas e realizados cortes histológicos na região mediana dos bulbinhos para verificar o número e tamanho das células.

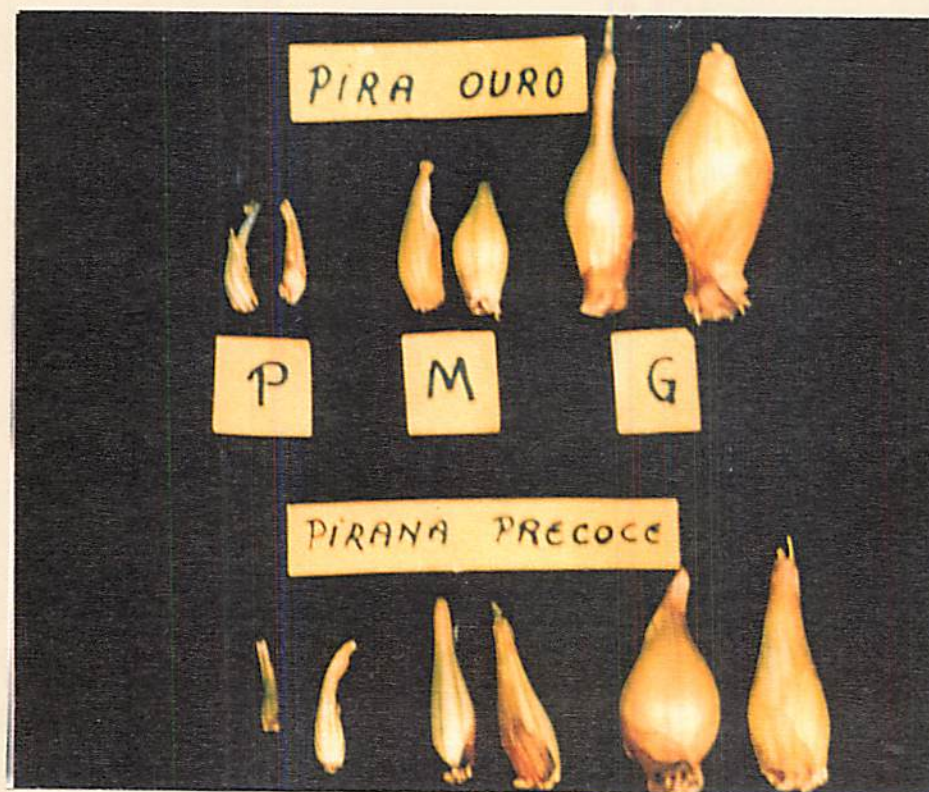


FIGURA 33. Bulbinhos das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce dentro dos diâmetros P (< 5,0 mm); M (5,0 a 10,0 mm) e G (> 10,0 mm).

O peso da matéria fresca e seca foram obtidos através de balança eletrônica de precisão. Para a determinação do peso da matéria seca, utilizou-se uma amostra de bulbinhos dentro de cada diâmetro, onde desses bulbinhos, foram retirados segmentos com igual peso da matéria fresca, os quais foram submetidos à uma temperatura de $\pm 50^{\circ}\text{C}$ para a secagem.

Para avaliar o número e tamanho das células presentes nas túnicas foram tomadas amostras de bulbinhos dentro de cada diâmetro, para cada cultivar.

Os cortes histológicos foram feitos à mão livre e corados com azul de toluidina a 10%. Foram montadas lâminas semi-permanentes e as avaliações foram realizadas através de microscópio de luz com acessório para câmara clara. Estas avaliações foram realizadas no Laboratório de Citologia e Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da ESAL.

Os bulbinhos, após serem seccionados no sentido transversal a 5mm da base e no sentido longitudinal por uma vez (destruindo-se o meristema principal), foram utilizados como explantes e inoculados em tubos de ensaio contendo o meio MS, sacarose (30 g/L), BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L) para Pira Ouro e BAP (4,0 mg/L) x ANA (0,5 mg/L) para Pirana Precoce. Após a adição dos fitorreguladores, o pH do meio foi ajustado para 5,9 e em seguida solidificado com agar (7,0 g/L).

Os tubos contendo o meio de cultura foram fechados com tampas plásticas e esterilizados em autoclave horizontal a 120°C e 1 atmosfera de pressão, durante 20 minutos, antes da inoculação dos explantes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 3 tratamentos, correspondendo aos diâmetros dos bulbinhos, 4 repetições e parcelas representadas por 8 explantes.

Aos 40 dias foram avaliadas a frequência de regeneração (%), número médio de brotos por bulbinho e as correlações entre peso de matéria fresca e seca, número de túnicas, frequência de regeneração, e número de brotos por bulbinho para as cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce (3º Experimento) e aos 80 dias foram avaliados a porcentagem de regeneração e o número de brotos por explante (1º e 2º Experimentos).

Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas de luz e escuro, temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e aproximadamente 1.500 lux de luminosidade.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Efeito de BAP x ANA na micropropagação a partir de bulbinhos obtidos *in vitro*

As cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce (Tabela 21) não diferiram estatisticamente para porcentagem de regeneração ($P < 0,05$) pelo teste de X^2 , realizado através da Tabela de Contingência. No entanto, quanto a posição do explante, não foram realizados testes estatísticos, porém a posição vertical está mostrando maior tendência para porcentagem de regeneração, possivelmente devido ao maior contato do tecido basal com o meio de cultura, proporcionando assim maior absorção de nutrientes.

TABELA 21. Porcentagem de regeneração de plântulas a partir de bulbinho colocado em diferentes posições no meio de cultura.

Cultivar	Posição	
	Vertical (%)	Horizontal (%)
Pira Ouro	50,0	37,5
Pirana Precoce	61,5	46,1

Na cultivar Pira Ouro (Tabela 22), a porcentagem de regeneração não mostrou diferenças significativas ($P < 0,05$) pelo Teste de X^2 , realizado através da Tabela de Contingência para as combinações de BAP x ANA. Esses resultados foram semelhantes aos observados para explante primário (bulbo), quando não se verificou diferenças entre as doses 0,0 e 0,5 mg/L de ANA e entre as doses de BAP que variaram de 0,5 a 4,0 mg/L (Capítulo 3). Quanto à cultivar Pirana Precoce, diferenças significativas para porcentagem de regeneração foram observadas nas combinações de BAP x ANA ($P < 0,05$) pelo Teste de X^2 , sendo as

maiores porcentagens (57,2 e 66,7) observadas para BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L) e BAP (4,0 mg/L) x ANA (0,5 mg/L), respectivamente.

TABELA 22. Porcentagem de regeneração dos explantes em meio contendo diferentes concentrações de BAP x ANA.

ANA (mg/L)	Pira Ouro		Pirana Precoce	
	BAP (mg/L)		BAP (mg/L)	
	2,0	4,0	2,0	4,0
0,25	50,0	35,7	57,2	42,9
0,50	43,8	37,5	33,4	66,7

Maior número de brotos por explante secundário foi observado em BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L), para as duas cultivares, (Tabelas 23). No entanto, a cultivar Pirana Precoce tem demonstrado ser mais renegerativa em relação à Pira Ouro, mostrando uma taxa de multiplicação de 16,8 brotos por bulbinhos.

TABELA 23. Número médio de brotos regenerados por explante em diferentes concentrações de BAP x ANA. Avaliação aos 80 dias.

ANA (mg/L)	Pira Ouro		Pirana Precoce	
	BAP (mg/L)		BAP (mg/L)	
	2,0	4,0	2,0	4,0
0,25	4,8±1,5	3,1±1,2	8,4±1,7	4,3±2,6
0,50	2,6±0,9	2,2±0,8	1,0±0,6	3,7±1,5

± = Desvio padrão da média.

A cultivar Pira Ouro tem mostrado maior número de brotos na concentração mais baixa de ANA (0,25 mg/L). Talvez o uso de apenas duas concentrações em intervalos bem próximos possa estar mascarando os resultados e mostrando uma tendência para a dose mais baixa, discordando assim dos resultados verificados para explante primário, onde os melhores resultados foram observados na dose mais elevada de ANA (1,0 mg/L) (Capítulo III). Russey e Falavigna (1980) encontraram melhores respostas para número de brotos da cultivar Senshyu, tanto para explante primário como secundário, em ausência de ANA.

5.4.2 Micropropagação através de bulbinhos desenvolvidos em meios com diferentes concentrações de sacarose

Tanto a cultivar Pira Ouro quanto o Híbrido-120 mostraram diferenças nas médias para porcentagem de regeneração e número médio de brotos por explante (Tabela 24), com relação aos bulbinhos originados em diferentes concentrações de sacarose.

Pela Tabela 25 observa-se para a cultivar Pira Ouro, que bulbinhos desenvolvidos em 30 e 60 g/L de sacarose não mostraram respostas morfogênicas quanto à capacidade de regeneração, sendo estas observadas somente em 90 e 120 g/L de sacarose, onde a maior porcentagem de regeneração (50%) e maior número médio de brotos por explante (5,5) foram para bulbinhos desenvolvidos em 120 g/L de sacarose.

No Híbrido-120 (Tabela 25), apenas bulbinhos desenvolvidos em 30 g/L de sacarose não mostraram respostas quanto à capacidade de regeneração e número médio de brotos por explante, e a maior porcentagem de regeneração (41,3) e maior número de brotos por explante (4,3) também foram observados para bulbinhos desenvolvidos em 120 g/L de sacarose.

TABELA 24. Resumo das análises de variância para porcentagem de regeneração e número médio de brotos por explante de bulbinhos da cultivar Pira Ouro e Híbrido-120, originados em diferentes concentrações de sacarose, em meio MS com BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L). Avaliação aos 80 dias.

F.V.	G.L.	Quadrados Médios			
		Pira Ouro		Híbrido-120	
		Porcentagem Regeneração ⁽¹⁾	Número Brotos ⁽²⁾	Porcentagem Regeneração ⁽¹⁾	Número Brotos ⁽²⁾
Sacarose	3	1,668,0010**	2,1163**	861,5816*	1,0983*
Resíduo	8	18,7500	0,0514	157,6977	0,2484
C.V. (%)		19,544	15,385	49,054	31,726

(1) Dados transformados para arco seno $\sqrt{x/100}$.

(2) Dados transformados para $\sqrt{x+0,5}$ transform

* Significativo ao nível de 5% pelo Teste F.

** Significativo ao nível de 1% pelo Teste F.

TABELA 25. Porcentagem de regeneração e número médio de brotos por explantes de bulbinhos da cultivar Pira Ouro e Híbrido-120 desenvolvidos em diferentes concentrações de sacarose em meio MS com BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L). Avaliação aos 80 dias.⁽¹⁾ Avali

Sacarose (g/L)	Pira Ouro		Híbrido-120	
	Porcentagem Regeneração	Número Brotos	Porcentagem Regeneração	Número Brotos
30	0,1 b	0,1 b	0,1 b	0,1 b
60	0,1 b	0,1 b	18,6 ab	1,6 ab
90	41,3 a	3,1 a	32,9 a	2,9 ab
120	50,0 a	5,5 a	41,3 a	4,3 a

(1) Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

O número médio de brotos por explante secundário observado para Pira Ouro (5,5) e o Híbrido-120 (4,3) no meio MS suplementado com BAP (2,0 mg/L) e ANA (0,25 mg/L)

(Tabela 25) a partir de bulbinhos desenvolvidos em 120 g/L de sacarose estão próximos ao observado por Kahane, Rancillac e de la Serve (1992) com o clone R-160, onde obteve 4,6 brotos por explante em meio MS suplementado com Kin (2,1 mg/L) x ANA (0,9 mg/L) e 5,0 em meio com BAP (1,1 mg/L) e ANA (0,9 mg/L).

Takayama e Misawa (1980) observaram que altas concentrações de sacarose tem causado dormência em bulbinhos de *Lilium* formados *in vitro*. A baixa frequência de regeneração observada em bulbinhos da cultivar Pira Ouro e o Híbrido-120 também pode estar relacionada com uma possível dormência, discordando portanto dos resultados obtidos por Mohamed-Yasseen, Splittstoesser e Litz (1994), onde bulbinhos de alho e chalota formados *in vitro* quando transferidos para aclimação não apresentaram efeitos de dormência.

A idade da planta mãe influencia a taxa de regeneração do explante, assim como o tipo e concentração de reguladores de crescimento afetam o desenvolvimento das plântulas (Kahane, Rancillac e de la Serve, 1992). Um dos fatores que pode ter contribuído para a baixa frequência de regeneração no Híbrido-120 e em Pira Ouro, é a idade dos bulbinhos (6 meses de cultivo *in vitro*).

5.4.3 Influência do tamanho do bulbinho na frequência de regeneração *in vitro*

Pelos resultados obtidos com a cultivar Pira Ouro (Tabela 26), não se observaram diferenças significativas entre as médias das variáveis frequência de regeneração e número médio de brotos por bulbinho, enquanto que para 'Pirana Precoce', para as mesmas variáveis, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$).

Observa-se na cultivar Pirana Precoce (Tabela 27), que para frequência de regeneração, bulbinhos com diâmetros M e P comportaram-se semelhantemente, apresentando 86,44% e 78,43% de regeneração, respectivamente, e estes apresentaram

TABELA 26. Resumo das análises de variância para frequência de regeneração (%) e número médio de brotos por bulbinho das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce. Avaliação aos 40 dias.

F.V.	G.L.	Quadrados Médios			
		Pira Ouro		Pirana Precoce	
		Frequência Regeneração ⁽¹⁾	Número Brotos ⁽²⁾	Frequência Regeneração ⁽¹⁾	Número Brotos ⁽²⁾
Diâmetro	2	87,39	1,10	1.241,20*	3,01*
Resíduo	9	216,09	0,69	155,53	0,32
C.V. (%)		41,80	37,81	22,53	18,29

⁽¹⁾ Dados transformados para arco seno $\sqrt{x/100}$.

⁽²⁾ Dados transformados para $\sqrt{x+0,5}$.

* Significativo ao nível de 5%, pelo Teste F.

TABELA 27. Frequência de regeneração (%) de explantes e número de brotos por bulbinho das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce. Avaliação aos 40 dias.

Diâmetro bulbinho*	Pira Ouro		Pirana Precoce	
	Frequência Regeneração	Número Brotos	Frequência Regeneração	Número Brotos
P	24,98 a	3,53a	78,43 a	4,60 b
M	35,33 a	4,56a	86,44 a	15,44 a
G	39,70 a	4,91a	33,40 b	8,75 ab

* P (< 5,0 mm); M (5,0 mm a 10,0 mm); G (>10,0 mm).

¹ Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

diferenças significativas ($P < 0,05$) do diâmetro G, o qual apresentou frequência de regeneração relativamente baixa (33,40%). Para Pira Ouro, os resultados sugerem que no processo de micropropagação poderão ser utilizados bulbinhos com os três diâmetros,

[REDACTED]

TABLE 1. Summary of the results of the analysis of variance for the different factors of the experiment. The values in parentheses are the degrees of freedom for each factor.

Source of variation		Sum of squares		Mean squares		F-value	
		SS	df	MS	df	F	df
Between groups	1	10.5	1	10.5	1	10.5	1
Within groups	2	10.5	1	10.5	1	10.5	1
Total	3	21.0	2	10.5	2	10.5	2

TABLE 2. Summary of the results of the analysis of variance for the different factors of the experiment. The values in parentheses are the degrees of freedom for each factor.

Source of variation		Sum of squares		Mean squares		F-value	
		SS	df	MS	df	F	df
Between groups	1	10.5	1	10.5	1	10.5	1
Within groups	2	10.5	1	10.5	1	10.5	1
Total	3	21.0	2	10.5	2	10.5	2

TABLE 3. Summary of the results of the analysis of variance for the different factors of the experiment. The values in parentheses are the degrees of freedom for each factor.

Source of variation		Sum of squares		Mean squares		F-value	
		SS	df	MS	df	F	df
Between groups	1	10.5	1	10.5	1	10.5	1
Within groups	2	10.5	1	10.5	1	10.5	1
Total	3	21.0	2	10.5	2	10.5	2

entretanto as maiores freqüências foram observadas para os diâmetros G e M com 39,70 e 35,33% de regeneração, respectivamente. Já na cultivar Pirana Precoce os bulbinhos com diâmetros M e P, foram os que apresentaram melhores resultados.

Com relação ao número médio de brotos por bulbinho, (Tabela 27), a cultivar Pira Ouro não mostrou diferença significativa entre as médias, porém o diâmetro G foi o melhor com 4,91 brotos por bulbinho, enquanto que para a cultivar Pirana Precoce os diâmetros M e G não diferiram estatisticamente ($P < 0,05$), porém a maior média foi de 15,44 brotos por bulbinho observada no diâmetro M.

A cultivar Pira Ouro apresentou maior freqüência de regeneração e maior número de brotos por bulbinho no diâmetro G, enquanto a cultivar Pirana Precoce apresentou melhores respostas no diâmetro M.

Kahane, Rancillac e de la Serve (1992) citam que, para o sucesso do processo de multiplicação cíclica, os explantes secundários (bulbinhos) devem apresentar diâmetros maiores que 10 mm, no entanto para a cultivar Pirana Precoce isto não foi observado, pois os diâmetros entre P (< 5 mm) e M (5 a 10 mm) apresentaram freqüências de regeneração bem superiores a G ($> 10,0$ mm). Apenas a cultivar Pira Ouro mostrou maior freqüência de regeneração média para bulbinhos com diâmetro G (> 10 mm), embora nesta cultivar as médias não tenham diferido estatisticamente.

Esses dados sugerem que a maior freqüência de regeneração e maior número de brotos por bulbinhos estão mais relacionados com o genótipo do que propriamente o diâmetro do bulbinho utilizado inicialmente no processo de micropropagação.

Observa-se também que as duas cultivares apresentaram comportamentos inversos com relação à freqüência de regeneração (Tabelas 28 e 29). Este comportamento pode ser devido a vários fatores como curto período de avaliação (40 dias), influência das diferentes combinações de BAP x ANA utilizada para cada cultivar, ou até mesmo o genótipo

The first of these is the fact that the data are not normally distributed. This is evident from the fact that the data are not symmetrically distributed about the mean. The second is the fact that the data are not independent. This is evident from the fact that the data are correlated.

The third is the fact that the data are not normally distributed. This is evident from the fact that the data are not symmetrically distributed about the mean. The fourth is the fact that the data are not independent. This is evident from the fact that the data are correlated.

The fifth is the fact that the data are not normally distributed. This is evident from the fact that the data are not symmetrically distributed about the mean. The sixth is the fact that the data are not independent. This is evident from the fact that the data are correlated.

The seventh is the fact that the data are not normally distributed. This is evident from the fact that the data are not symmetrically distributed about the mean. The eighth is the fact that the data are not independent. This is evident from the fact that the data are correlated.

The ninth is the fact that the data are not normally distributed. This is evident from the fact that the data are not symmetrically distributed about the mean. The tenth is the fact that the data are not independent. This is evident from the fact that the data are correlated.

The eleventh is the fact that the data are not normally distributed. This is evident from the fact that the data are not symmetrically distributed about the mean. The twelfth is the fact that the data are not independent. This is evident from the fact that the data are correlated.

do explante. A cultivar Pirana Precoce, além de apresentar maior número de brotos no diâmetro M, também apresentou um potencial regenerativo superior ao de Pira Ouro, a qual não mostrou diferenças entre as médias para número de brotos.

TABELA 28. Resultados médios do peso de matéria fresca, peso de matéria seca, número de túnicas, frequência de regeneração e número de brotos por bulbinho da cultivar Pira Ouro.¹

Diâmetro Bulbinho*	Peso da Matéria Fresca (mg)	Peso da Matéria Seca (mg)	Número Túnicas	Frequência Regeneração ² (%)	Número Brotos ²
P	463,45 b	158,60	2,94 b	24,98 a	3,53 a
M	830,00 b	102,10	4,56 a	35,33 a	4,56 a
G	2.352,57 a	75,20	5,44 a	39,70 a	4,91 a

* P (< 5,0 mm); M (5,0 a 10,0 mm); G (>10,0 mm).

¹ Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

² Avaliação aos 40 dias.

TABELA 29. Resultados médios do peso de matéria fresca, peso de matéria seca, número de túnicas, frequência de regeneração e número de brotos por bulbinho da cultivar Pirana Precoce.¹

Diâmetro Bulbinho*	Peso da Matéria Fresca (mg)	Peso da Matéria Seca (mg)	Número Túnicas	Frequência Regeneração ² (%)	Número Brotos ²
P	519,60 c	124,30	3,56 b	78,43 a	4,60 b
M	820,35 b	73,40	4,88 a	86,44 a	15,44 a
G	2.044,90 a	57,40	4,82 a	33,40 b	8,75 ab

* P (< 5,0 mm); M (5,0 a 10,0 mm); G (>10,0 mm).

¹ Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

² Avaliação aos 40 dias.

De acordo com os cortes histológicos realizados em amostras de bulbinhos apresentando diferentes diâmetros, observou-se que as duas cultivares apresentaram, dentro dos três diâmetros, número de túnicas variando de 3 a 6, porém com frequências diferentes. No entanto, dentro de um mesmo diâmetro, o tamanho das células estava inversamente relacionado com o número de túnicas, ou seja, quanto maior o número de túnicas, menor o tamanho das células ($>$ número), e quanto menor o número de túnicas, maior o tamanho das células ($<$ número).

Verificou-se que, quanto maior o diâmetro do bulbinho, maior também foi o tamanho das células presentes nas túnicas mais externas. Esperava-se encontrar maior número de túnicas nos bulbinhos com diâmetros maiores, entretanto esses resultados não foram observados.

Observa-se nas Tabelas 28 e 29 que as duas cultivares apresentaram o mesmo comportamento para peso de matéria fresca, peso de matéria seca e número de túnicas, ou seja em peso de matéria fresca a maior média observada no diâmetro G diferiu das demais. Para peso de matéria seca a maior média foi para o diâmetro P; enquanto para número de túnicas as médias observadas nos diâmetros G e M foram estatisticamente iguais, porém um pouco mais elevada no diâmetro M para Pirana Precoce, e no diâmetro G para Pira Ouro.

A cultivar Pira Ouro (Tabela 28) não mostrou diferenças entre as médias para frequência de regeneração e número de brotos, entretanto maior frequência de regeneração (39,70%) foi observada no diâmetro G e maior número de brotos (4,91) também foi observado no diâmetro G.

Na cultivar Pirana Precoce (Tabela 29), as médias observadas para frequência de regeneração nos diâmetros P e M foram iguais estatisticamente, porém superior no diâmetro M (86,44), enquanto para número de brotos as médias dos diâmetros M e G não diferiram entre si, porém o diâmetro M apresentou maior média (15,44).

Verificou-se que as duas cultivares (Tabela 30) apresentaram correlações altas e negativas para peso de matéria fresca e peso de matéria seca, indicando que quanto maior o peso da matéria fresca, menor foi o peso da matéria seca e correlações altas e negativas também para peso de matéria seca e número de túnicas, indicando que quanto maior o peso de matéria seca, menor também foi o número de túnicas.

TABELA 30. Resultados das correlações entre peso da matéria fresca (P.M.F.), peso da matéria seca (P.M.S.), número de túnicas (N.T.), frequência de regeneração (F.R.) e número de brotos por bulbinho (N.B.), das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce. Avaliação aos 40 dias.

VARIÁVEIS	CULTIVARES	
	PIRA OURO	PIRANA PRECOCE
P.M.F. - P.M.S.	- 0,858	- 0,809
P.M.F. - N.T.	0,866	0,627
P.M.F. - F.R.	- 0,998*	0,606
P.M.F. - N.B.	- 0,733	- 0,651
P.M.S. - N.T.	- 1,000*	- 0,965
P.M.S. - F.R.	0,886	- 0,958
P.M.S. - N.B.	0,279	0,079
N.T. - F.R.	- 0,894	1,000*
N.T. - N.B.	- 0,295	0,184
F.R. - N.B.	0,692	0,210

* - Significativo ao nível de 5%, pelo Teste T ($r > 0,997$).

Para as variáveis peso de matéria seca e frequência de regeneração, a cultivar Pira Ouro apresentou correlação alta e positiva (0,886), enquanto que para Pirana Precoce foi alta e negativa (-0,958), indicando que quanto maior o peso da matéria seca, maior foi a frequência de regeneração para Pira Ouro, e quanto maior o peso da matéria seca, menor a frequência de regeneração para Pirana Precoce. Para as variáveis número de túnicas e frequência de regeneração a correlação foi alta e negativa (-0,894) para Pira Ouro, enquanto

que para Pirana Precoce esta foi alta e positiva (1,000), assim, quanto maior o número de túnicas, menor foi a frequência de regeneração para Pira Ouro, e quanto maior o número de túnicas, maior foi a frequência de regeneração para Pirana Precoce.

A cultivar Pira Ouro apresentou correlação alta e positiva entre peso de matéria fresca e número de túnicas e (0,866), indicando que quanto maior o peso da matéria fresca, maior foi o número de túnicas; e correlação alta e negativa entre peso de matéria fresca e frequência de regeneração (-0,998), ou seja, quanto maior o peso da matéria fresca, menor foi a frequência de regeneração.

Apesar das variáveis peso de matéria fresca, peso de matéria seca e número de túnicas terem apresentado o mesmo comportamento entre as duas cultivares e mostrarem altas correlações entre peso de matéria fresca e peso de matéria seca, peso de matéria seca e número de túnicas, estas não poderão ser utilizadas para correlacionar com frequência de regeneração e número de brotos, em materiais de cebola, haja visto que pelas cultivares utilizadas o comportamento da cultivar Pira Ouro foi distinto da cultivar Pirana Precoce. Estes resultados sugerem que a capacidade de regeneração *in vitro* de cada cultivar está mais relacionada à fatores morfogenéticos do que morfológicos, pois os bulbinhos apresentaram as mesmas características morfológicas e responderam diferentemente *in vitro*, mostrando ser este fator inerente à cada cultivar e independente do diâmetro utilizado.

5.5 CONCLUSÕES

A posição vertical se mostrou mais adequada em relação à horizontal quanto à porcentagem de regeneração. Na cultivar Pira Ouro a porcentagem de regeneração apresentou o mesmo comportamento nas concentrações de BAP x ANA, enquanto na cultivar Pirana Precoce os melhores resultados foram obtidos, nas concentrações de BAP (2,0 mg/L) x

ANA (0,25 mg/L) e BAP (4,0 mg/L) x ANA (0,5 mg/L). Maior número médio de brotos por explantes foram observados para as duas cultivares em BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L), resultando numa taxa de multiplicação de $4,8 \times 2 = 9,6$ brotos por bulbinho para Pira Ouro e $8,4 \times 2 = 16,8$ brotos por bulbinho para Pirana Precoce.

Com relação à concentração de sacarose de origem dos bulbinhos, maior regeneração de brotos foi observada para bulbinhos desenvolvidos em 120 g/L de sacarose, tanto para a cultivar Pira Ouro como para o Híbrido-120.

Na cultivar Pira Ouro, os três diâmetros de bulbinhos utilizados mostraram comportamentos semelhantes tanto para frequência de regeneração, quanto para número médio de brotos por explante. Na cultivar Pirana Precoce, as maiores porcentagens de regeneração foram observadas nos diâmetros M e P, sendo que maior número de brotos por bulbinho foi observado no diâmetro M.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FUJIEDA, K.; MATSUOKA, N.; FUJITA, Y. Vegetative multiplication of onion, *Allium cepa* L., through tissue culture. **Journal Japanese Society for Horticultural Science**, v.48, n.2, p.459-467, 1979.
- HUSSEY, F. In vitro propagation of onion *Allium cepa* by axillary and adventitious shoot proliferation. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v.9, p.227-236, 1978.
- HUSSEY, F.; FALAVIGNA, F. Origin and production of in vitro adventitious shoots in the onion, *Allium cepa* L. **Journal of Experimental Botany**, London, v.31, n.125, p.1675-1686, 1980.
- KAHANE, R.; RANCILLAC, M.; DE LA SERVE, B.T. Long-term multiplication of onion (*Allium cepa* L.) by cyclic shoot regeneration in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.28, p.281-288, 1992.
- MOHAMED-YASSEEN, Y.; SPLITTSTOESSER, W.; LITZ, R.E. In vitro shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.36, p.243-247, 1994.
- TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Differentiation in *Lilium* bulb scales grown in vitro. Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differential and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation in vitro. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.48, p.121-125, 1980.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um protocolo para micropropagação e manutenção *in vitro* de plantas macho-estéreis de cebola (*Allium cepa* L.), visando a produção de híbridos.

Os explantes utilizados inicialmente foram extraídos de bulbos das cultivares Pira Ouro, Pirana Precoce e Baia Piriforme. Devido às grandes dificuldades encontradas no estabelecimento da cultura *in vitro*, quanto às contaminações bacterianas, foram realizados vários experimentos para a desinfestação dos explantes, sendo que o uso de duas assepsias, sendo a segunda aplicada sobre segmentos menores (Figura 34) com variação da concentração de NaClO, do tempo de imersão, com o uso ou não de cloranfenicol na água de lavagem, mostraram as melhores respostas.

Após a assepsia procurou-se determinar qual a melhor combinação de fitoreguladores para a obtenção de maior frequência de regeneração como também a obtenção de maior número de brotos. Os explantes de tecido basal foram inicialmente inoculados em meio MS suplementado com BAP x ANA e as gemas caulinares em BAP x AIB. A cultivar Pira Ouro mostrou uma tendência para maior porcentagem de regeneração e maior número de brotos na maior dose de ANA (1,0 mg/L), mostrando portanto ser exigente em auxina, e apresentando maior taxa de regeneração (20,6 plântulas por bulbo) em BAP (4,0 mg/L) x ANA (1,0 mg/L). Os explantes de tecido basal se mostraram mais apropriados por apresentarem maior taxa de multiplicação, não inviabilizando, portanto, o uso de gemas caulinares simultaneamente, pois mesmo apresentando a maior taxa de multiplicação (6,5

broto por gema) em BAP (2,0 mg/L) x AIB (0,5 mg/L), os dois explantes são extraídos de um mesmo órgão (bulbo).

As plântulas regeneradas *in vitro* a partir de tecidos de bulbos foram induzidas inicialmente à bulbificação *in vitro*, para posteriormente, esses bulbinhos serem micropropagados num sistema de multiplicação cíclica (Figura 35).

Dentre os vários fatores que afetam a bulbificação *in vitro* foram avaliados o efeito da temperatura, sacarose, consistência do meio, diâmetro do explante, nitrogênio, e fotoperíodo. Verificou-se que a temperatura de 30°C induziu maior desenvolvimento de bulbinhos das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce. Concentrações mais elevadas de sacarose (90 e 120 g/L) mostraram maior bulbificação e menor desenvolvimento da parte aérea tanto para Pira Ouro quanto para o híbrido intervarietal. Com relação à consistência do meio e diâmetro do explante, o meio sólido se mostrou mais apropriado para a bulbificação *in vitro* das cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce, mostrando médias mais elevadas para todas as variáveis analisadas, enquanto que a influência do diâmetro do explante pareceu estar mais relacionada com a cultivar utilizada. Para garantir o sucesso da bulbificação, plântulas com diâmetro basal maior que 2,0 mm poderão ser mais adequadas. Apesar da ocorrência de bulbificação em fotoperíodo de 12/12 horas, o fotoperíodo de 16/8 horas de luz e escuro induziu o desenvolvimento de bulbinhos mais vigorosos na cultivar Pira Ouro, enquanto que para nitrogênio total não se verificou o efeito das diferentes doses no processo de bulbificação.

Como já mencionado os bulbinhos obtidos *in vitro* também foram utilizados como explante secundário e inoculados em meio MS com combinações de BAP x ANA, visando a indução de brotações. Maior número de brotos a partir desses bulbinhos foi observado em BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L), com 9,6 brotos para Pira Ouro e 16,8 para Pirana Precoce.

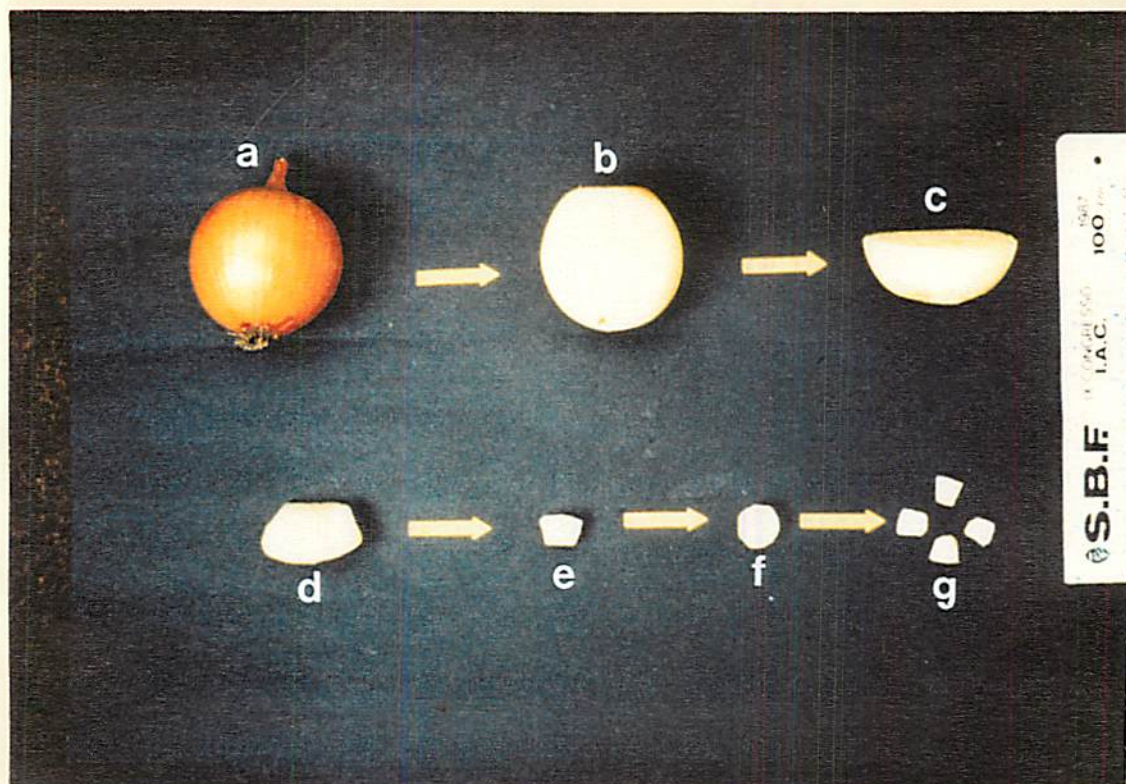


FIGURA 34. Obtenção de explante a partir de bulbos. A - bulbo adulto; B e C - toalete e corte transversal; D - toalete nas laterais; E e F segmento com $\pm 1 \text{ mm}^2$; G - segmento seccionado duas vezes resultando em 4 explantes.

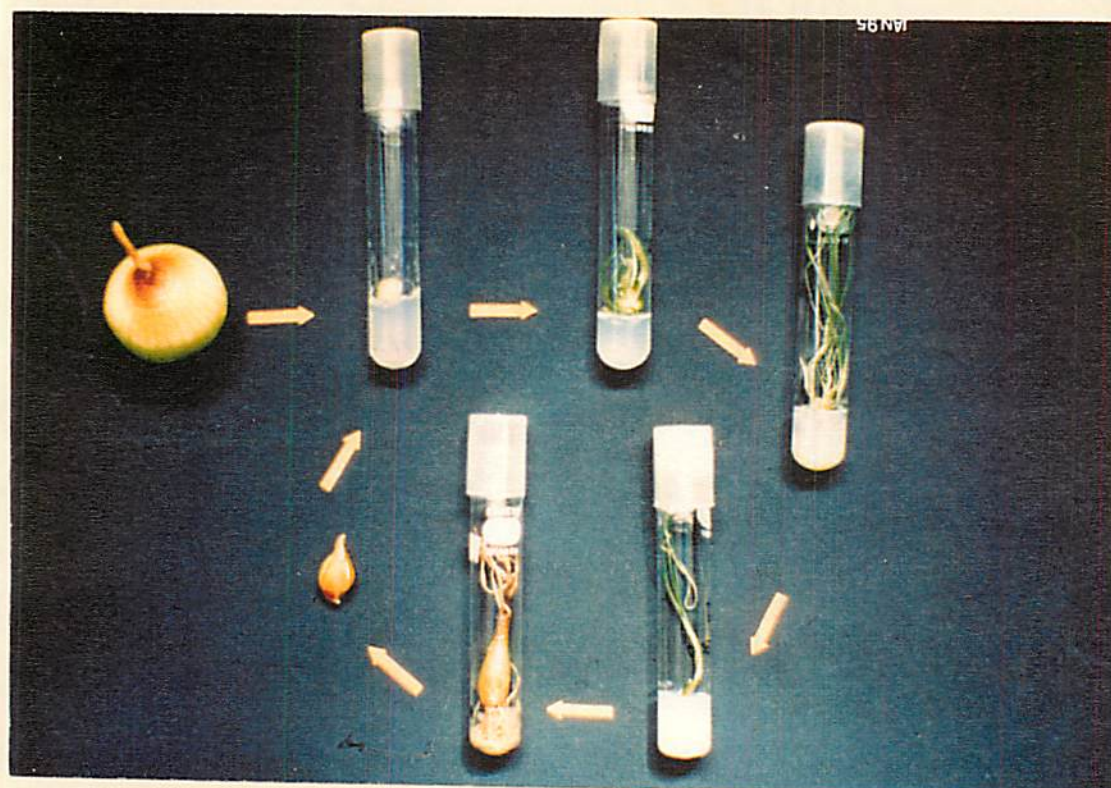


FIGURA 35. Esquema de multiplicação cíclica a partir de bulbo adulto e bulbinho *in vitro*.

A concentração de sacarose de origem dos bulbinhos também influenciou na multiplicação, onde tanto a cultivar Pira Ouro, quanto o híbrido intervarietal mostraram maiores taxas de multiplicação para os bulbinhos desenvolvidos em 120 e 90 g/L de sacarose.

Quanto ao diâmetro do bulbinho, este não mostrou ser um fator determinante da taxa de multiplicação. Pelos nossos resultados a taxa de multiplicação está mais relacionada com o genótipo do explante do que com as características morfológicas. Verificou-se que a cultivar Pira Ouro não mostrou influência do diâmetro do explante na taxa de multiplicação, enquanto a cultivar Pirana Precoce apresentou maior porcentagem de regeneração (86,44%) e maior número de brotos (15,44), em bulbinhos com diâmetro M (5,00 a 10,00 mm).

Também observou-se nas condições do presente trabalho, que a cultivar Pirana Precoce apresentou um potencial regenerativo superior ao verificado para a cultivar Pira Ouro.