

# MICROPROPAGAÇÃO E BULBIFICAÇÃO *IN VITRO* DE ALHO (*Allium sativum* L.)

## *IN VITRO* MICROPROPAGATION AND BULBING OF GARLIC (*ALLIUM SATIVUM* L.)

ANA ELISA DE OLIVEIRA E LONGO<sup>1</sup>, WALTER JOSÉ SIQUEIRA<sup>2</sup>, ILENE RIBEIRO DA SILVA PASSOS<sup>3</sup>,  
MARTA DIAS SOARES SCOTT<sup>4</sup>, JOAQUIM ADELINO DE AZEVEDO FILHO<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda do programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical do Instituto Agronômico de Campinas/IAC – Av. Barão de Itapura – 1.481 – Caixa Postal 28 – CEP 13020-902 – Campinas, SP – anaelisalongo@gmail.com

<sup>2</sup>Pesquisador do Instituto Agronômico de Campinas/IAC – Av. Theodureto de Almeida Camargo – n° 1500 – Caixa Postal 28 – CEP 13020-902 – Campinas, SP – walterjs@iac.sp.gov.br

<sup>3</sup>Pesquisadora do Instituto Agronômico de Campinas/IAC – Av. Theodureto de Almeida Camargo – n° 1500 – Caixa Postal 28 – CEP 13020-902 – Campinas, SP – irpassos@iac.sp.gov.br

<sup>4</sup>Pesquisadora do Instituto Agronômico de Campinas/IAC – Av. Theodureto de Almeida Camargo – n° 1500 – Caixa Postal 28 – CEP 13020-902 – Campinas, SP – scott@iac.sp.gov.br

<sup>5</sup>Pesquisador do Pólo Regional Leste Paulista/APTA – Estrada Municipal Monte Alegre – Pinhalzinho Km 03 – Caixa Postal 01 – CEP 13910-000 – Monte Alegre do Sul – SP – joaquimadelino@apta.sp.gov.br

### RESUMO

O alho é uma espécie de propagação vegetativa, assim o melhoramento genético se baseia em métodos que gerem variabilidade genética, como indução de mutações, variação somaclonal, fusão de protoplastos e transformação genética. Para que estes métodos possam ser aplicados é necessário o desenvolvimento de protocolos eficientes de regeneração de plantas e bulbificação *in vitro*. Neste trabalho, objetivou-se o estudo de meios de cultura para o crescimento de ápices caulinares com posterior bulbificação *in vitro* da cultivar comercial IAC-Lavínia 1632 (clone 19). Foram testadas, inicialmente, diferentes concentrações de BAP (0; 5; 10; 20; 40 µM) com posteriores combinações de cinetina (0; 15; 20; 25; 30 µM de BAP x 0; 5; 10; 15; 20 µM de KIN). Para indução de bulbificação *in vitro* foram avaliados meios com diferentes concentrações de sacarose (30; 40; 50; 60 e 70 g L<sup>-1</sup>), meio MS (completo e metade da concentração) e presença e ausência dos compostos nitrogenados (KNO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>). A análise estatística foi baseada no delineamento inteiramente casualizado com testes de médias e regressões polinomiais no SANEST. Os resultados evidenciaram que a melhor concentração de BAP para crescimento de ápices caulinares de alho foi 5 µM, com aumento significativo da massa fresca de bulbos. Houve interação significativa entre os dois reguladores de crescimento (BAP x KIN) para altura de planta. Para aumento de massa de bulbo e senescência de folhas deve-se aumentar a concentração de sacarose para 50 g L<sup>-1</sup>, manter os compostos do meio MS, mas com ausência de sais nitrogenados.

**Termos para indexação:** Ápices caulinares, reguladores de crescimento, nitrogênio, sacarose.

### ABSTRACT

Garlic is a vegetatively propagated species, so its genetic improvement is based on methods that generate genetic variability,

such as mutation, somaclonal variation, protoplast fusion, as well as on genetic engineering. Efficient protocols for the development of plant regeneration and subsequent *in vitro* bulbing are important for the employment of some of these methods. The present paper aimed to study *in vitro* culture media for garlic micropagation and bulbing of IAC-Lavínia 1632 (clone 19) cultivar. Different BAP (0; 5; 10; 20; 40 µM) concentrations as well as combinations of BAP and KIN (0; 15; 20; 25; 30 µM BAP x 0; 5; 10; 15; 20 µM KIN) were tested for the development of garlic meristematic apices. For bulbing, media with different concentrations of sucrose (30; 40; 50; 60 e 70 g.L<sup>-1</sup>), MS medium (full and half concentration) and the presence and absence of nitrogenous compounds (KNO<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) were tested. Statistical analysis was based on completely random design with multiple comparisons and polynomial regressions of SANEST. The results indicated that the best concentration of BAP for growing meristematic garlic apices was 5 µM, with significant increase in fresh mass of bulbs. Significant interaction was observed between these two growth regulators (BAP x KIN) for plant height. In order to increase the mass of the bulb and leaves senescence the sucrose concentration should be increased to 50 g L<sup>-1</sup>, keeping the compounds of the MS medium, but with no nitrogen salts.

**Index terms:** Shoot apices, growth regulators, nitrogen, sucrose.

### INTRODUÇÃO

O Brasil é, atualmente, muito carente em novas cultivares disponíveis aos produtores e são poucos os programas de melhoramento para a espécie *Allium sativum*. O principal fator é a ausência de recombinação genética pelo processo meiótico, em decorrência de ser o alho, botanicamente, de propagação assexuada (ZEWDIE et al., 2005).

(Recebido em 13 de abril de 2011 e aprovado em 31 de agosto de 2012)

Para a obtenção de novas cultivares, o melhoramento genético baseia-se na seleção de plantas mutantes naturais ou induzidos, exploração da variação somaclonal (KAEPLER et al., 2000), fusão de protoplastos e ,atualmente, por meio de transformação genética (MARTÍN-URDÍROZ et al., 2004).

A transformação genética mostra-se promissora no desenvolvimento de novas cultivares de alho. Entretanto, é necessário desenvolver protocolos regenerativos de plantas, a partir de diferentes tipos de explantes (ROBLEDO-PAS et al., 2000). Nesse sentido, ápices caulinares ou meristemáticos de alho, a exemplo de embriões nas outras espécies de propagação sexual, podem ser utilizados para transformação genética como fonte primária para biobalística ou co- cultivo com *Agrobacterium tumefaciens* (KENEL et al., 2010).

Para que isso seja estabelecido como rotina no laboratório é preciso desenvolver protocolos para o crescimento de ápices caulinares que, após o processo de transformação, se desenvolvam em plantas completas até a bulbificação *in vitro*, evitando perdas durante a aclimação das plantas (KIM et al., 2003).

O único trabalho que obteve sucesso na tentativa de induzir a bulbificação *in vitro*, utilizando estresse hídrico para aumentar o potencial osmótico do meio de cultura adicionou altas concentrações de sacarose (50 a 110 g L<sup>-1</sup>) (KIM et al., 2003).

Na cultura de ápices caulinares *in vitro*, é frequente o aumento do número de bulbos chochos por influência do fornecimento constante do nitrogênio do meio MS (COSTA et al., 1993). Sob condições de cultivo a campo, o distúrbio genético/fisiológico do alho conhecido como pseudoperfilhamento ou superbrotamento (MELO; OLIVEIRA, 1999), é muito comum nos alhos nobres e nos precoces e pode ser influenciado por altas concentrações de N e por alta umidade na fase de desenvolvimento dos bulbos (RESENDE; SOUZA, 2000). Há correlação da frequência de bulbos chochos com concentrações crescentes de N (MAROUELLI et al., 2002).

Objetivou-se, neste trabalho, realizar experimentações com a cultivar de alho comercial IAC Lavínia 1632 (clone 19), testando-se diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e em combinações com cinetina (KIN), seguida de bulbificação em diferentes concentrações de sacarose. Observou-se, também, o efeito da presença e ausência de compostos nitrogenados presentes no meio básico MS. no desenvolvimento dos bulbos e na senescência de folhas.

### MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado foi o clone 19 da cultivar IAC Lavínia 1632, obtido por cultura de tecidos *in vitro* (SIQUEIRA et al., 1996). Os explantes utilizados consistiram de ápices caulinares retirados de bulbilhos da cultivar de 0,3 a 0,5 mm, conforme descrito por Longo (2009). Os ápices e plantas foram inoculados em frascos com 40 mL de meio de cultura. Para todos os tratamentos, adotou-se o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) como básico com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. O meio MS foi suplementado com diferentes concentrações de BAP, cinetina e sacarose, conforme descrito para cada tratamento a seguir.

Todos os ápices excisados para uso nos experimentos permaneceram inicialmente no escuro, por uma semana a 25 ± 1° C. Em seguida, foram transferidos para sala de crescimento em iluminação artificial e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro 27/24° C (dia/noite) numa intensidade de 30 μmol. m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Estas foram as condições de cultivo para todos os tratamentos descritos a seguir.

Testaram-se diferentes concentrações de BAP (0; 5; 10; 20 e 40 μM). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e 10 repetições, sendo um ápice por frasco, uma repetição, totalizando 50 ápices. Após 30 dias, as plantas foram avaliadas quanto à altura (cm) e biomassa fresca (g). Em seguida, foram transferidas para meio MS, contendo 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose, visando à indução de bulbificação *in vitro* e foram mantidas por mais 30 dias. Após sete dias de cura

(secagem à temperatura ambiente), a biomassa seca dos bulbos obtidos foi medida (g). Em outro experimento foi avaliada a interação entre dois reguladores de crescimento em uma combinação fatorial de BAP (0; 15; 20; 25; 30  $\mu\text{M}$ ) x KIN (0; 5; 10; 15; 20  $\mu\text{M}$ ). O experimento foi conduzido no delineamento estatístico inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (5x5) com 12 repetições por tratamento, onde cada frasco continha um ápice como repetição, totalizando 300 ápices. Após 30 dias, as plantas foram avaliadas quanto à altura (cm).

As plantas obtidas no experimento anterior (BAP x KIN) foram transferidas para novos meios MS, contendo diferentes concentrações de sacarose (30; 40; 50; 60 e 70  $\text{g L}^{-1}$ ), visando à indução de bulbificação *in vitro*. Após 90 dias, foram avaliadas a razão bulbar, ou seja, a relação: diâmetro do pseudocaule na altura do colo/diâmetro da parte mediana do bulbo, proposta por Mann (1952); a biomassa seca e fresca (g) do bulbo e a porcentagem de plantas que formaram bulbos. Visando a avaliar a taxa de bulbificação *in vitro*, foram feitas modificações de concentração do meio MS (completo e  $\frac{1}{2}$  da concentração), presença e ausência dos compostos nitrogenados ( $\text{KNO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) e sacarose no controle do chochamento (perda de água) dos bulbos, em razão da emissão de brotos e não dormência após a bulbificação *in vitro*.

Para este experimento, foram inoculados 200 ápices caulinares para crescimento em MS com 5  $\mu\text{M}$  de BAP. As plantas obtidas foram distribuídas em 10 tratamentos: a) MS + 60  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose; b)  $\frac{1}{2}$  MS + 60  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose; c) MS (sem  $\text{KNO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) + 60  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose; d)  $\frac{1}{2}$  MS (sem  $\text{KNO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) + 60  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose; e) MS + 30  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose; f)  $\frac{1}{2}$  MS + 30  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose; g) MS (sem  $\text{KNO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) + 30  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose; h)  $\frac{1}{2}$  MS (sem  $\text{KNO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) + 30  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose; i) ágar-água + 60  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose; j) ágar-água + 30  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose. Cada tratamento foi constituído de 18 repetições, no delineamento inteiramente casualizado. Após 60 dias no meio de bulbificação, avaliaram-se características em escala de notas de 1 a 4 para a necrose ou senescência de folhas: nota 1- folhas completamente secas; nota 2- somente a

base da planta ainda verde; nota 3- planta com folhas verdes e somente com a ponta seca e nota 4- completamente verdes, além da biomassa seca (g) da parte aérea. Após 35 dias de cura (secagem à temperatura ambiente), a biomassa (g) de bulbos secos foi medida.

As análises de variância dos experimentos, os contrastes de médias e regressões polinomiais foram feitos no Programa SANEST (MACHADO; ZONTA, 1991). Utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparações entre as médias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, encontram-se os resultados obtidos de ápices caulinares do alho comercial IAC Lavínia 1632 (clone 19), em concentrações crescentes de BAP e que, após 30 dias, foram transferidas para meio MS com 60  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose para bulbificação.

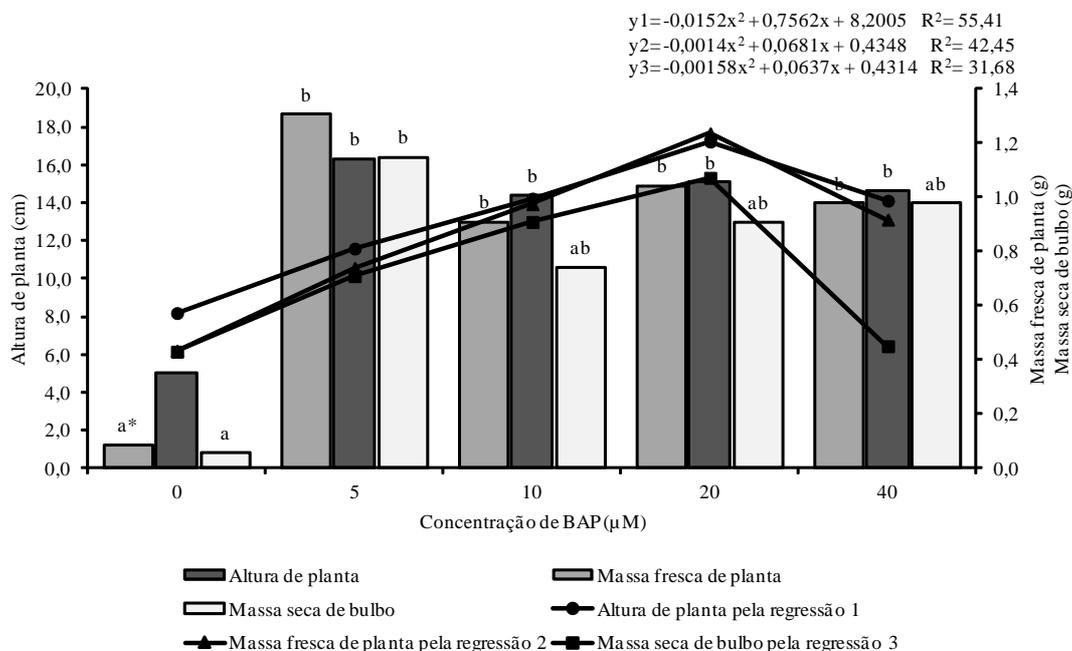
Embora não diferindo entre si, todas as concentrações de BAP promoveram maior altura da planta (Figura 1), diferindo significativamente do meio de cultura com ausência de BAP (controle). A mesma tendência foi observada para massa fresca de planta (Figura 1). Verificou-se ainda, que quanto à massa seca de bulbo (Figura 1) a menor concentração de BAP (5  $\mu\text{M}$ ) foi a única que diferiu estatisticamente da ausência desse regulador de crescimento.

A melhor concentração indicada para desenvolvimento de ápice caulinar nas condições do presente experimento deve ser a menor (5  $\mu\text{M}$ ) por questões relacionadas ao alto custo dos reguladores de crescimento e também para evitar riscos de hiperhidricidade dos explantes, muito comum com o uso de altas concentrações de BAP (IVANOVA et al., 2006).

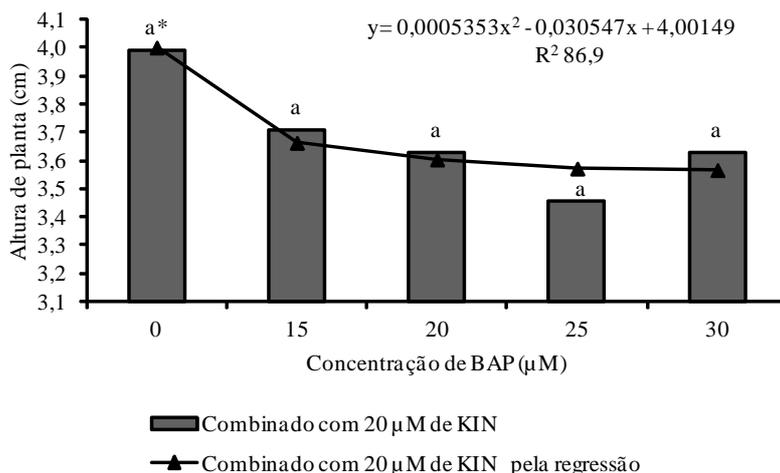
Em trabalhos semelhantes, com ápice caulinar da cultivar seminobre Amaranthe, apesar do explante estar determinado e competente para desenvolvimento (KERBAUY, 1999), também houve necessidade da adição de reguladores de crescimento como 2-*Ip*, AIB ou ANA (ILLG; SIQUEIRA, 1986; MORICONI et al., 1990; TORRES et al., 2000).

No experimento envolvendo KIN em combinação com BAP, estão apresentados nas Figuras 2 e 3 os valores mais expressivos de R<sup>2</sup> encontrados neste

trabalho (> 80,0%). Na Figura 2, observa-se que não houve diferenças de crescimento nas doses de BAP com 20 μM de KIN.



**FIGURA 1** – Médias das características: altura de planta (cm) massa fresca de planta (g) massa seca de bulbos (g); em meios contendo BAP (0; 5; 10; 20; 40 μM), da cultivar comercial de alho IAC-Lavínia 1632 (clone 19), com posterior transferência para sacarose (60 g L<sup>-1</sup>). \*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.



**FIGURA 2** – Concentrações de BAP (0; 15; 20; 25; 30 μM) para a característica altura de planta *in vitro* a partir de ápices caulinares da cultivar comercial de alho IAC-Lavínia 1632 (clone 19). \*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

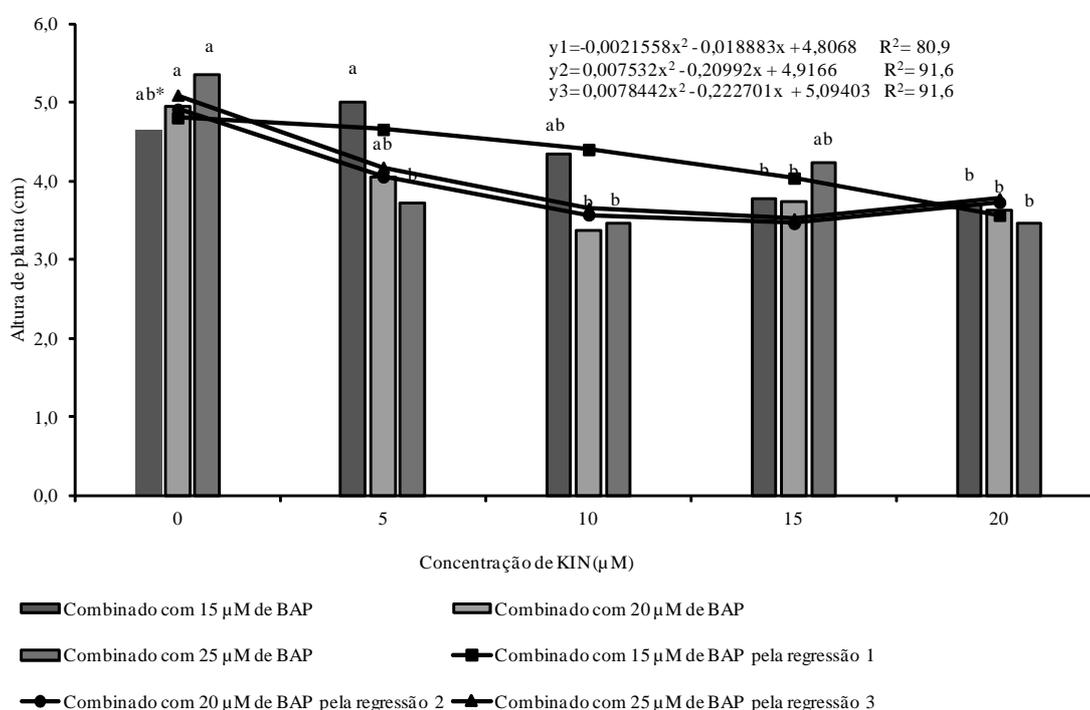
Ápices caulinares possuem competência e determinação para crescimento, desde que sejam fornecidas as condições necessárias de nutrição e luminosidade. Auxinas e citocininas endógenas são sintetizadas pelos primórdios foliares dos ápices caulinares e radícula, respectivamente, e podem suprir em parte a demanda para crescimento e enraizamento. A retomada do crescimento no sistema *in vitro* se dá por influência da presença de reguladores de crescimento e demais constituintes do meio de cultura (KERBAUY, 1999).

Conforme observado nas Figuras 2 e 3, conclui-se que podem ser utilizadas combinações das duas citocininas (KIN x BAP) e também o BAP isolado nos meios de cultura para crescimento de ápice caulinar do clone 19. O meio de cultura que proporcionou menor valor de altura de planta (3,31 cm) foi o tratamento 10  $\mu$ M de KIN x 20  $\mu$ M de BAP, diferindo, estatisticamente, apenas do tratamento 25  $\mu$ M

de BAP x 0  $\mu$ M de KIN com maior valor (5,39 cm) de altura de planta (Figura 3).

Após a avaliação da altura das plantas obtidas no experimento fatorial, estas foram transferidas para cinco tratamentos de meios de cultura com diferentes concentrações de sacarose para bulbificação *in vitro*. O gráfico das características razão bulbar (diâmetro do pseudocaulo pelo diâmetro maior do bulbo); biomassa seca e fresca (g) do bulbo e porcentagem de plantas que formaram bulbos visando à bulbificação *in vitro*, encontra-se na Figura 4.

Para razão bulbar, o menor valor indica conformação adequada de bulbo, onde a região da inserção do pseudocaulo é reduzida, favorecendo a cura com menores perdas de água. Quando a razão bulbar reduz-se a níveis inferiores a 0,5, o bulbo encontra-se completamente formado (MANN, 1952). Na Figura 4, observa-se que a razão bulbar próxima a ideal ( $\leq 0,5$ ) é a



**FIGURA 3** – Concentrações (15; 20; 25  $\mu$ M) de BAP e (0; 5; 10; 15; 20  $\mu$ M) de KIN no experimento fatorial para a característica altura da planta *in vitro* a partir de ápices caulinares da cultivar comercial de alho IAC-Lavínia 1632 (clone 19). \*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

de 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose, diferindo estatisticamente das demais concentrações.

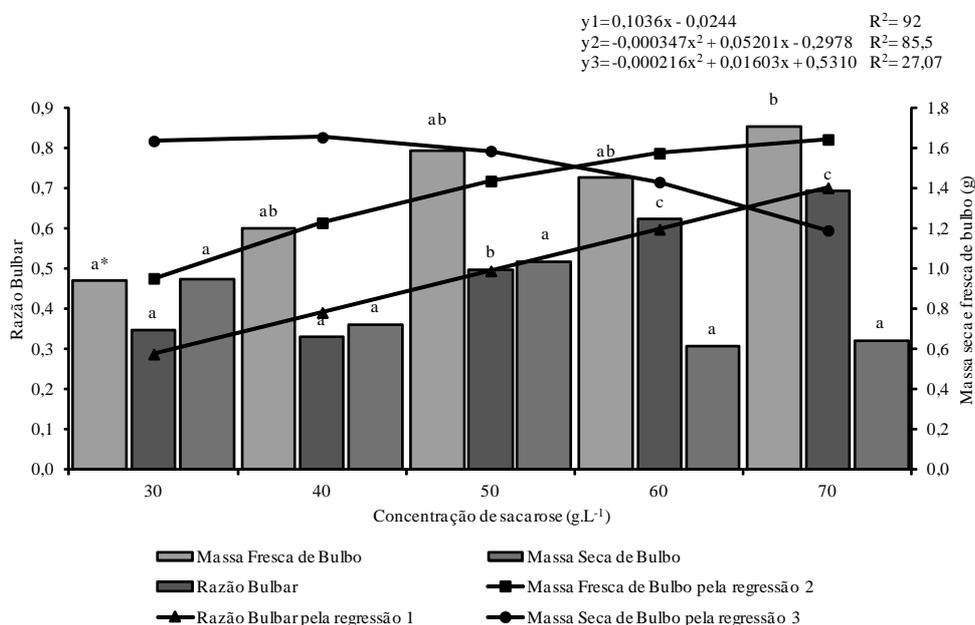
Na medida em que houve aumento da concentração de sacarose, houve resposta crescente para razão bulbar (Figura 4). Da mesma forma, a massa fresca de bulbo na concentração de sacarose 50 g L<sup>-1</sup> foi satisfatória (1,58 g), apesar de não mostrar diferença entre as demais concentrações de sacarose testadas (Figura 4). Meios de cultura que induzam maior massa fresca ou seca devem ser os selecionados, pois facilitarão a propagação posterior em substrato não estéril (RESENDE, 1993). Na Figura 4, observa-se decréscimo na característica de massa fresca (g) com a redução da concentração de sacarose no meio de cultura, o que também foi observado na característica da razão bulbar.

Não houve diferenças para massa seca de bulbo (Figura 4), mas por outro lado, houve contrastes significativos de massa fresca, indicando que a perda de água ou o acúmulo de água nos tecidos dos bulbos seguem

padrões distintos de acordo com a concentração de sacarose.

Pode-se concluir que a melhor concentração de sacarose no meio de cultura, após o crescimento do ápice caulinar para bulbificação de alho foi 50 g L<sup>-1</sup> por reunir os valores de máxima massa seca de bulbo e razão bulbar adequada ( $\leq 0,5$ ). Ressalte-se que, apesar de ser obtida a menor razão bulbar na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> (0,36), os valores de massa fresca e bulbificação foram inferiores a outros tratamentos.

Nos experimentos discutidos anteriormente, observou-se que a bulbificação ocorre *in vitro*, sem a interrupção do desenvolvimento vegetativo das plantas, como em condições naturais onde a planta entra em senescência com seca contínua das folhas até a maturação e dormência dos bulbos por ocasião da colheita. Nas condições *in vitro*, folhas novas continuam sendo emitidas e, por essa razão, os bulbos não entram em dormência, ocorrendo maior taxa de chochamento (perda de água do bulbo).



**FIGURA 4** – Concentrações de sacarose (30; 40; 50; 60; 70 g L<sup>-1</sup>), visando bulbificação *in vitro*, da cultivar comercial de alho IAC-Lavínia 1632 (clone 19), após a cultura das plantas no experimento de BAP x KIN, para as variáveis: razão bulbar, massa fresca e seca de bulbos (g). \*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

No sistema *in vitro* são fornecidos continuamente sais minerais (inclusive nitrogênio) além da elevada umidade relativa presentes nos frascos de cultura (MAGALHÃES, 1986). Avaliou-se a emissão de novas folhas (brotações), durante a fase de transferência para meio de cultura de bulbificação, modificando-se as concentrações do meio MS e as quantidades de sais nitrogenados, além de testar duas concentrações de sacarose.

As médias das características avaliadas de massa de bulbo (g), escala de notas (1 a 4) para aspecto da parte aérea, massa seca (g) de folha e de bulbo estão na Tabela 1.

A massa seca de folha foi de baixa discriminação para escolha de meios de cultura. Por outro lado, as variáveis de maior amplitude de variação foram escala de notas das folhas e biomassa seca de bulbo durante a fase final de bulbificação.

Observou-se (Tabela 1) que os meios de cultura com razão bulbar mais próxima do ideal ( $\leq 5,0$ ) foram aqueles que continham  $\frac{1}{2}$  MS + 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose e MS completo com 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose, porém ambos sem KNO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

É sabido que, reduzindo-se a disponibilidade do nitrogênio na fase de indução e crescimento do bulbo,

pode-se reduzir a produção de novas folhas, melhorando posteriormente sua conservação durante o processo de cura (BARKER; MILLS, 1980). As combinações de MS e nitrogênio na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose não mostraram efeito significativo no aumento da massa seca de bulbo e maior senescência de folhas.

Para aumento de massa de bulbo, simultaneamente, com a senescência de folhas, durante o processo de bulbificação *in vitro*, deve-se aumentar a concentração de sacarose, fornecer nutrientes pelo MS, mas retirar os compostos nitrogenados. Ressalte-se que a fase de crescimento de ápice é anterior a esse processo de bulbificação e necessita de condições favoráveis de nutrição.

Yuri et al (2004), com a cultivar nobre Caçador induziram, primeiro, o superbrotamento *in vitro* com a vernalização prévia dos bulbos (doadores de ápices) e depois transferiu para meio de crescimento dos mesmos. Com isso, obteve uma taxa de multiplicação inferior ao obtido por Moriconi et al. (1990) e por Illg (1995). Sugere-se, a partir do presente trabalho, a indução de superbrotamento de plantas *in vitro*, aumentando-se os

**TABELA 1** – Médias das características avaliadas: massa de bulbo (g), escala de notas (1 a 4) para necrose e coloração da parte aérea (folhas) e massa seca de folha de bulbo (g) em meios de cultura (1 a 10) com variação da concentração do meio MS, de sacarose e de nitrogênio para a cultivar comercial de alho IAC-Lavínia 1632 (clone 19).

Meios	Massa Seca de Folha (g) <sup>(1)</sup>	Escala de Notas das Folhas <sup>(2,5)</sup>	Massa Seca Bulbo (g) <sup>(3)</sup>
MS + 60 Sac.	0,17bc	2,20bcd	0,73a <sup>(4)</sup>
$\frac{1}{2}$ MS + 60 Sac.	0,21bc	2,07bcd	0,57ab
MS + 60 Sac. s/N	0,11bc	1,43d	0,40abc
$\frac{1}{2}$ MS + 60 Sac. s/N	0,09c	1,53cd	0,48abc
MS + 30 Sac.	0,40a	3,63a	0,24bcd
$\frac{1}{2}$ MS + 30 Sac.	0,26ab	2,34bcd	0,30bcd
MS + 30 Sac. s/N	0,11bc	2,54ab	0,23cd
$\frac{1}{2}$ MS + 30 sac. s/N	0,12bc	2,14bcd	0,27bcd
ágar-água + 60 sac.	0,11bc	1,32d	0,19cd
ágar-água + 30 sac.	0,20bc	2,48abc	0,08d

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

compostos nitrogenados do meio MS e depois a transferência das plantas para meio com alta concentração de sacarose para bulbificação.

### CONCLUSÕES

Para crescimento inicial de ápice caulinar e posterior formação de bulbo *in vitro*, o meio mais adequado é MS acrescido de 5 µM de BAP. Para aumento da biomassa de bulbo com a senescência de folhas, durante o processo de bulbificação *in vitro*, deve-se aumentar a concentração de sacarose para 50 g L<sup>-1</sup>, e retirar os compostos nitrogenados.

### AGRADECIMENTOS

À Técnica de laboratório Raully Máximo Rabello Moretti, pela colaboração no desenvolvimento dos experimentos no Laboratório de Cultura de Tecidos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARKER, A. V.; MILLS, H. A. Ammonium and nitrate nutrition of horticultural crops. In: JOHN WILEY; SONS, INC., HOBOKEN. **Horticultural Reviews**, Volume 2, New Jersey, USA: J. Janick, 1980, p.395-423.
- COSTA, T. M. P.; SOUZA, R.J.; SILVA, A.M. Efeitos de diferentes lâminas de água e doses de nitrogênio sobre a cultura do alho (*Allium sativum* L. cv. Juréia). **Ciência e Prática**, v.17, n.3, p. 239-246, 1993.
- ILLG, R. D.; SIQUEIRA, W. J. Variação somaclonal em alho. **Informe Agropecuário**, v.12, n.142, p.12-17. 1986.
- ILLG, R. D. Alho (*Allium sativum* L.). Produção de Microbulbilhos de alta qualidade. In: Lee Sheng Gerald. **Biofábricas: Produção industrial de plantas in vitro**. Araras: Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 1995. p.52-61.
- IVANOVA, M. et al. Endogenous cytokinins in shoots of *Aloe polyphylla* cultured *in vitro* in relation to hyperhydricity, exogenous cytokinins and gelling agents. **Plant Growth Regulation**, v.50, p.219-230, 2006.
- KAEPLER, S. M.; KAEPLER, H.F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v.43, p. 179–188, 2000.
- KENEL, F.; EADY, C.; BRINCH, S. Efficient *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum*) immature leaf tissue. **Plant Cell Reports**, v.29, p. 223-230, 2010.
- KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1999. v.2, p.519-531.
- KIM, E. K. et al. High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid cultures. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v.73, p.231-236, 2003.
- LONGO, A. E. O. **Micropropagação de alho e ginogênese in vitro de cebola**. 2009. 130 p. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) - Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Campinas, 2009.
- MANN, L.K. Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. **Hilgardia**, v.21, n.8, p.195-251, 1952.
- MACHADO, A. A.; ZONTA, E. P. **Manual do SANEST: Sistema para análise estatística para microcomputadores**. Pelotas, UFPel, p.102, 1995.
- MAGALHÃES, J. R. Nutrição mineral de alho. **Informe Agropecuário**, v.12, n.148, p.20-30, 1986.
- MARQUELLI, W. A. et al. Produção e qualidade de alho sob regimes de água no solo e doses de nitrogênio. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.2, p.191-194, 2002.
- MARTÍN-URDÍROZ, N. et al. Effect of light on the organogenic ability of garlic roots using a one-step *in vitro* system. **Plant Cell Reports**, v.22, p.721-724, 2004.
- MELO, J. P. L.; OLIVEIRA, A. P. Produção de alho em função de diferentes níveis de água e esterco bovino no solo. **Horticultura Brasileira**, v.17, n.1, p.11-15, 1999.
- MORICONI, D. N.; CONCI, V. C.; NOME, S. F. Rapid multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) *in vitro*. **Phyton**, v.51, n.2, p.145-151, 1990.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

RESENDE, F.V. **Comportamento em condições de campo, de plantas de alho (*Allium sativum* L.) obtidas por cultura de meristemas**. 63 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1993.

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

ROBLEDO-PAS, A.; VILLALOBOS-ARÁMBULA, V. M.; JOFRE-GARFIAS, A. E. An efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by root-tip culture. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**, v.36, n.5, p.416-419, 2000.

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

TORRES, A. C. et al. Shoot tip culture and thermotherapy in recovering virus free plants of garlic. **Horticultura Brasileira**, v.18, n.3, p.192-195, 2000.

YURI, J. E. et al. Vernalização do alho para cultivo *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.3, p. 585-588, 2004.

ZEWDIE, Y. et al. The first genetic linkages among expressed regions of the garlic genome. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.130, n. 4, p. 569-574, 2005.